

プロスタグランジン輸送体OATP2A1を介したPGE2分泌と炎症への影響

著者	御勢 智香
著者別表示	Gose Tomoka
雑誌名	博士論文本文Full
学位授与番号	13301甲第4525号
学位名	博士（薬学）
学位授与年月日	2017-03-22
URL	http://hdl.handle.net/2297/48153



博士論文

プロスタグランジン輸送体 OATP2A1 を介した PGE₂ 分泌と炎症への影響

金沢大学大学院医薬保健学総合研究科

薬学専攻

薬物動態学研究室

学 籍 番 号 1328052004

氏 名 御勢智香

主任指導教員名 玉井郁巳 教授

目次

略語表.....	1
----------	---

序論.....	3
---------	---

第一章 炎症組織の PGE₂ および PGE₃ 動態における OATP2A1 の役割

第一節 諸言.....	7
-------------	---

第二節 実験方法.....	10
---------------	----

- ・ 試薬
- ・ 細胞培養
- ・ 実験動物
- ・ 輸送体過剰発現 HEK293 細胞を用いた取込み試験
- ・ ヒト MRP4 発現膜ベシクルを用いた取込み試験
- ・ EPA-E 投与炎症モデルマウスの作製
- ・ 各組織の採取
- ・ 組織からの PGE₂、PGE₃ 抽出
- ・ LC-MS/MS による定量
- ・ 各組織からの RNA 抽出および qRT-PCR
- ・ 細胞増殖試験 (SRB Assay)
- ・ HEK293 細胞からの RNA 抽出および qRT-PCR
- ・ データ解析

第三節 実験結果.....	16
---------------	----

- ・ OATP2A1、OATP1B1、OATP 2B1、OAT1、OCT1、OCT2 の輸送活性の評価
- ・ OATP2A1、OATP1B1、OATP 2B1、OAT1、OCT1、OCT2 の PGE₃ 認識性
- ・ MRP4 による PGE₃ 輸送
- ・ OATP2A1 を介した PGE₃ および PGE₂ の濃度依存性
- ・ OATP2A1 を介した PGE₃ および PGE₂ 輸送の相互作用
- ・ LPS/EPA-E 投与 *Slco2a1* 欠損マウスの各組織 PGE₃ および PGE₂ の定量
- ・ LPS/EPA-E 投与 *Slco2a1* 欠損マウスの各組織の Cox-2 mRNA 発現
- ・ 細胞増殖における PGE₃ の効果

- ・ PGE₃ 処置による VEGF mRNA 発現量の変化における OATP2A1 の影響

第四節 考察.....28

第二章 脾臓における OATP2A1 の役割

第一節 諸言.....31

第二節 実験方法.....33

- ・ 試薬および実験動物
- ・ 免疫組織化学染色による脾臓 Oatp2a1 および F4/80 陽性細胞の局在
- ・ Hematoxylin-eosin (HE) 染色
- ・ Picrosirius red 染色
- ・ 炎症モデルマウスの作製
- ・ 組織からの PGE₂ 抽出
- ・ LC-MS/MS による定量
- ・ Western blotting
- ・ 脾臓からの RNA 抽出および qRT-PCR
- ・ データ解析

第三節 実験結果.....37

- ・ マウス脾臓における Oatp2a1 の局在
- ・ マウス脾臓における F4/80 陽性細胞の局在
- ・ 高週齢 *Slco2a1* 欠損マウスの脾臓の相対重量
- ・ 高週齢 *Slco2a1* 欠損マウスの脾臓組織構造
- ・ 高週齢 *Slco2a1* 欠損マウスの脾臓のコラーゲンの蓄積
- ・ 高週齢 *Slco2a1* 欠損マウスの各組織 PGE₂ の定量
- ・ 高週齢 *Slco2a1* 欠損マウスの脾臓 Cox-2 および 15-Pgdh タンパク質発現
- ・ LPS 誘発性急性炎症モデルマウスの脾臓 Oatp2a1 および PGE₂ 関連酵素の発現変動
- ・ LPS 誘発性急性炎症モデル *Slco2a1* 欠損マウスの脾臓の相対重量

第四節 考察.....46

第三章 PGE₂ 分泌における細胞内 OATP2A1 の役割

第一節 諸言.....	49
第二節 実験方法.....	51
• 試薬および実験動物	
• 細胞培養	
• 腹腔 Mφ の単離	
• 腹腔 Mφ からの PGE ₂ 産生試験	
• 腹腔 Mφ および RAW264 細胞からの PGE ₂ 分泌試験	
• Mφ 培養上清および細胞懸濁液からの PGE ₂ 抽出	
• LC-MS/MS による PGE ₂ および PGE ₂ 代謝物の定量	
• データ解析	
第三節 実験結果.....	54
• LPS 刺激 RAW264 細胞の d4-PGE ₂ 代謝物または PGE ₂ 代謝物の産生に対する TGBz の阻害効果	
• <i>Slco2a1</i> 欠損による腹腔 Mφ の PGE ₂ 産生への影響	
• <i>Slco2a1</i> 欠損による腹腔 Mφ の PGE ₂ 代謝・分泌への影響	
• RAW264 細胞の PGE ₂ 代謝・分泌に対する TGBz の阻害効果	
• PGE ₂ 分泌の初期段階における <i>Oatp2a1</i> の影響	
第四節 考察.....	62
結論.....	64
引用文献.....	66
参考論文.....	75
謝辞.....	76

略語表

13-PGR: 15-ketoprostaglandin Δ 13, 14-reductase
15-PGDH: 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase
AA: Arachidonic acid
ABC: ATP-binding cassette
AMP: Adenosine monophosphate
ATP: Adenosine triphosphate
BHT: Dibutylhydroxytoluene
BSA: Bovine serum albumin
cDNA: Complimentary DNA
COX: Cyclooxygenase
DAB: 3, 3'-Diaminobenzidine
D-MEM: Dulbecco's modified Eagle's medium
DNA: Deoxyribonucleic acid
EP: Prostaglandin E receptor
EPA: Eicosapentaenoic acid
ESI: Electrospray ionization
FBS: Fetal bovine serum
GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
HEPES: N-2-hydroxy-ethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid
Hprt: Hypoxanthine phosphoribosyltransferase
HRP: Horseradish peroxidase
hPrC: Human prostaglandin carrier
IgG: Immunoglobulin G
 K_m : Michaelis constant
LC-MS/MS: Liquid chromatogram-tandem mass spectrometry
LPS: Lipopolysaccharide
LOX: Lipoxygenase
 $M\phi$: Macrophage
mRNA: Messenger RNA
MRP: Multidrug resistance associated protein
MS: Mass spectrometry
OAT: Organic anion transporter
OATP: Organic anion transporting polypeptide
OCT: Organic cation transporter

OAT-PG: Prostaglandin-specific organic anion transporter
PBS: Phosphate buffered saline
PFA: Paraformaldehyde
PG: Prostaglandin
PGEMs: Prostaglandin E metabolites
PGES: PGE synthase
PLA₂: Phospholipase A₂
qRT-PCR: Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction
RNA: Ribonucleic acid
S.E.: Standard error
TBS-T: Tris- buffered saline and Tween 20
VMAT: Vesicular monoamine transporter
WT: Wild type
TB: Transport buffer

序論

細胞内で脂質を原料として合成される生理活性物質の脂質メディエーターは、血圧や消化管機能の調整、炎症、疼痛、発熱、免疫応答、細胞増殖や分化制御など幅広い生理機能を持ち、生命維持や疾患発症と密接に関わる(1, 2)。脂質メディエーターには、プロスタグランジン (PG) 類やロイコトリエン類、スフィンゴシン-1-リン酸などがあり、産生や代謝に関わる酵素やシグナルを伝達する受容体を中心に脂質メディエーターの役割が研究されてきた。特に、炭素数 20 個からなる PG 類やロイコトリエン類、トロンボキサン類などの生理活性物質は総称してエイコサノイドと呼ばれ、生体内において作用部位で産生され、生理作用を発揮し、その場で消失するオートコイドとして機能する。哺乳類は ω -6 系脂肪酸から ω -3 系脂肪酸を合成できず、食物に含まれる α -リノレン酸やエイコサペンタエン酸 (EPA) などの ω -3 系脂肪酸由来のエイコサノイドはアラキドン酸 (AA) などの ω -6 系脂肪酸由来のエイコサノイドの働きを調節することが知られている (Figure 1) (3, 4)。これらのオートコイドは低分子化合物であり、細胞内で合成されて細胞外の受容体に作用して機能を発現するためには、細胞膜を透過する必要がある。しかし、これらエイコサノイドの膜透過性とその生理活性に及ぼす影響については十分な知見が得られておらず、これまで十分に考慮されないまま生命現象が説明されてきた。

古くからPG類などの膜透過性について研究が行われ、ウサギ赤血球細胞によるPG類の取り込みがショ糖とほぼ等しく(5)、PG類は極めて膜透過性が低いことから膜透過には輸送体の必要性が指摘されてきた。1995年、KanaiらはZinc finger proteinとして報告されていたラットMatrinF/Gの開始コドンから380塩基遡ったAUCが真の翻訳開始点であることを突き止め、新たに判明した翻訳領域を含めた遺伝子配列が有機アニオンを輸送する肝臓型Organic anion transporting polypeptide (Oatp) 1a1と高い相同性を有することを報告した(6)。したがって、Kanaiらはアフリカツメガエル卵母細胞にMatrinF/Gを発現させ有機アニオン輸送能を解析した結果、PGE₂に高い親和性を有する輸送体として機能することを見いだした(6)。本輸送担体はPGE₂、PGF_{2 α} およびPGD₂などのPG類を選択的に輸送することから、プロスタグランジン輸送体 (PGT) として命名された。その後、ヒトおよびマウスについてもPGTのホモログがクローニングされ、ラットPGTとほぼ同様の機能を有することが示された(7)。2004年以来、HUGO遺伝子命名法委員会によりPGTをコードする遺伝子はSLCO2A1として登録された。一方、当研究室では、PGTの遺伝配列に高い相当性を持つOATP-B (OATP2B1/SLCO2B1)、OATP-C (OATP1B1/SLCO1B1)、OATP-D (OATP3A1 /SLCO3A1)、OATP-E (OATP4A1/SLCO4A1) にもPGE₂輸送活性があることを報告した(8)。

筆者が研究を開始した時点において、ヒトにおいて細胞形質膜に発現してPGE₂を取込む輸送体として、有機アニオン輸送体 (OATP1A2/SLCO1A2)(9)、OAT1 /SLC22A6、OAT2 /SLC22A7、

OAT3/*SLC22A8*、OAT4/*SLC22A11*）、有機カチオン輸送体（OCT1/*SLC22A1*、OCT2/*SLC22A2*(10)）、hPrC/*hPrC*(11)、およびOST α/β /*SLC51a/b*(12)が報告されていた。また、ATPの加水分解によるエネルギーを駆動力とする一次性能動輸送体であるABC（ATP-binding Cassette）輸送体のうち、特にMRP4/*ABCC4*はPGE₂の強い輸送活性を有する(13)。しかし、これらの輸送体がどのようにPGE₂の膜輸送を分担し、その生理活性調節に働くかについては、十分に理解されていなかった。これら輸送体の中でも、OATP2A1のPGE₂に対する親和性（ K_m ）は高く、ほぼ全ての組織に発現することから(14)、PG類の生理活性に及ぼす影響が研究されてきた。特にPG類の主要代謝臓器である肺(15)に高い発現を示す(16)ため、肺または肺組織血管内皮細胞に発現するOATP2A1は血液中からのPGE₂取込みに機能しすると考えられてきた。細胞形質膜に発現するOATP2A1はNa⁺非依存的にPGE₂を細胞内に取込み、乳酸の外向き濃度勾配を駆動力とする(17)。細胞内へ取込まれたPGE₂は細胞内に発現する代謝酵素15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase（15-PGDH）により不活性化されることから、OATP2A1は細胞内にPGE₂を取込むことでPGE₂の不活性化を促進する(18)。

AA由来PGE₂は、細胞刺激により細胞内でcyclooxygenase-2 (COX-2) / PGE synthase (PGES) を介して産生された後(19-21)、細胞外でPGE受容体（EP1-4）に作用することで、炎症、疼痛、発熱や免疫応答など様々な生体反応に関与する。これまでにPGE₂の病態への関与について、PGE₂の合成酵素や受容体の遺伝子改変動物を用いた検討により明らかにされてきた（Table 1）(22-32)。一方で、生体内におけるOATP2A1のPGE₂作用調節は遺伝子改変動物や選択的阻害剤を用いて研究されてきた。*Slco2a1*遺伝子欠損（*Slco2a1*^{-/-}）マウスでは動脈管開存症が発症し生後1日以内に産仔が死亡するため、OATP2A1が出生後の動脈管の閉鎖に重要であることが示された(33)。さらに、*Slco2a1*^{-/-}マウスのPGE₂尿中排泄は、WTと比較して有意に増加した(33)。また、OATP2A1の生理機能を検証するために、Chiらは独自に作成したトリアジンライブラリーから1842個の化合物をスクリーニングし、TGBz T34を含む第一世代の選択的阻害剤の合成に成功した(34)。現在、TGBz T34誘導体である第2世代阻害剤としてT26AがPGE₂産生に影響を与えずOATP2A1に対して最も選択性の高い阻害剤として使用されている。T26Aを全身投与したマウスにおいてもPGE₂血漿中濃度の増加が確認された(35)。げっ歯類を用いた種々の病態モデルでは、OATP2A1機能阻害剤は血圧抑制(36)、創傷治癒促進(37)、排卵抑制(38)効果など示すことから、阻害剤は血漿あるいは間質中のPGE₂濃度を増加させるために、PGE₂の作用を増強する。これらの研究成果は、気管内にブレオマイシンを投与した*Slco2a1*^{-/-}マウスの気道および肺胞中におけるPGE₂量の増加が肺線維化と関係することを示した当研究室の結果とも一致する(39)。

ばち状指はPGE₂代謝異常を原因とする原発性肥大性骨関節症の症状の一つである。近年ヒトにおいて機能欠損型*SLCO2A1*遺伝子変異とばち状指との相関が指摘され、OATP2A1がPGE₂代謝異常を誘引することが示唆された(40)。しかし、興味深いことにOATP2A1機能欠損

型遺伝子変異 (LOFm) 保有者の尿中PGE₂代謝物量が健常者より増大することが複数の研究者により明らかにされている(40-42)。また、非特異性多発性小腸潰瘍症の原因遺伝子として*SLCO2A1*が同定された(43)。消化管潰瘍の原因として消化管粘膜中PGE₂の欠乏があるが、これまで報告されてきたOATP2A1の機能からは、*SLCO2A1* LOFmによる局所でのPGE₂欠乏が説明できないため、PGE₂動態におけるOATP2A1の新たな機能が示唆されている。

当研究室は、OATP2A1が細胞形質膜だけでなく、細胞質や核などの細胞内に発現することに着眼し研究を展開した。Shimadaらはマウス由来マクロファージ (Mφ) における細胞内酸性コンパートメントにおいてPGE₂とOatp2a1が共存することを見出した(44)。細胞形質膜に発現するOATP2A1と同様にPGE₂取込みに機能し細胞内のPGE₂をリソソームなどの酸性コンパートメントへ輸送し、細胞内へのCa²⁺流入などの刺激により蓄積されたPGE₂が開口分泌されるというこれまでにないOATP2A1の役割を提唱した。この仮説は、*Slco2a1*^{-/-}由来MφからのPGE₂分泌がWTと比較して低下するという実験結果により支持され、Oatp2a1機能喪失がPGE₂分泌の低下を招くことを示した。PGE₂の動態調節はPGE₂の作用を左右するため、本来PGE₂の作用は輸送体の機能を考慮した上で解析されなければならないが、これまで専らPGE₂合成酵素や受容体が研究されてきたために、PGE₂作用調節因子としての輸送体の役割に関する情報はほぼ欠落している。したがって、OATP2A1がPGE₂の生理活性に果たす役割を詳細に理解するためには、細胞あるいは組織ごとにOATP2A1の発現とPGE₂動態を関連付けていく研究展開が求められる。

本研究においては、PGE₂の作用に対するOATP2A1の役割を理解するうえで、PGE₂の炎症作用を緩和する働きが知られているPGE₃とOATP2A1との関係に着目した。炎症時 ω -6系脂肪酸のAA由来PGE₂と同時にCOX-2/PGES経路により ω -3系脂肪酸のEPAからPGE₃が産生される。しかし、PGE₃の膜透過機構についての情報は乏しく、PGE₃の膜透過がPGE₂の生理活性に及ぼす影響についてはこれまで考慮されていなかった。PGE₂と構造が類似するPGE₃ (Figure 2) がOATP2A1に認識されるなら、PGE₃によりOATP2A1を介したPGE₂の作用を調節できる可能性がある。

そこで、第一章では、生体内のPGE₂およびPGE₃分布におけるOATP2A1の役割について、炎症を誘発させたWTと*Slco2a1*^{-/-}マウスの各組織PGE₂、PGE₃量を比較することで評価した。さらに、*in vitro*実験系でPGE₃に対するOATP2A1の輸送特性およびOATP2A1を介したPGE₂の作用に対するPGE₃の影響を検討し、生体内においてPGE₃がOATP2A1を介したPGE₂動態・作用に与える影響を考察した。第二章では、*Slco2a1*^{-/-}マウスにおいて、唯一PGE₂量が低下した脾臓に着目した。炎症により活性化されたMφはPGE₂を盛んに合成すること(45)、脾臓に多く存在すること(46)、さらにPGE₂合成抑制は脾腫と関連することなどから(47)、MφにおけるOATP2A1の役割が脾臓に与える生理的役割をマウスモデルにより評価した。さらに、

第三章では、*Slco2a1*欠損による脾臓PGE₂量の低下は、MφのOatp2a1を介したPGE₂分泌が消失することでPGE₂の不活性化が促進したことによるという仮説を検証することを目的に、マウス腹腔MφおよびマウスMφモデルRAW264細胞を用いて、MφのPGE₂分泌におけるOATP2A1の役割をPGE₂とその代謝物を測定することで評価した。

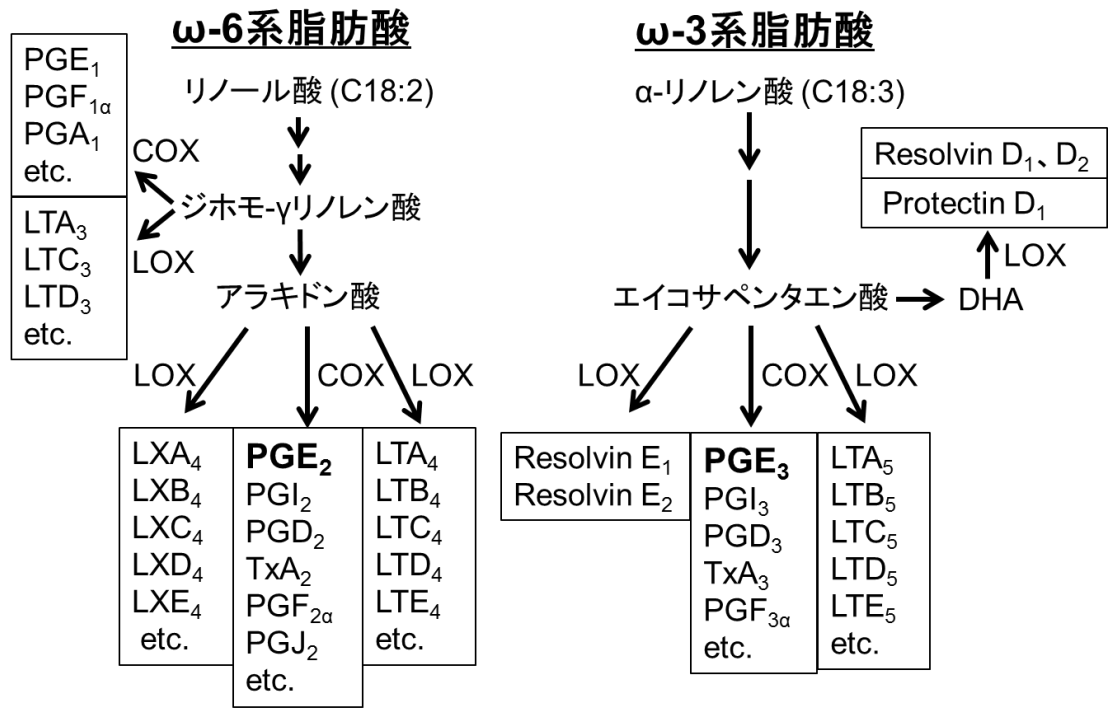


Figure 1 Metabolism of ω -3 and ω -6 essential fatty acids.

Table 1 The phenotypes of PGE₂-related protein knockout mice.

PGE ₂ 受容体/酵素	欠損マウスの表現型
EP1	反復ストレスによる長期的な情動変容の異常、ACTH産生減弱
EP2	排卵・受精の減少、塩分感受性高血圧、大腸ポリープの減少
EP3	発熱反応消失、血管新生の抑制
EP4	動脈管の開存、骨形成の消失、炎症性腸疾患の増悪
COX-2	肺線維症の増悪、動脈管の開存
mPGES-1	T細胞依存性液性免疫の抑制、炎症性腸疾患の増悪、アルツハイマー病様症状の抑制

第一章 炎症組織の PGE₂ および PGE₃ 動態における OATP2A1 の役割

第一節 諸言

細胞の脂質二重膜を構成する多価不飽和脂肪酸は、 ω -6 系脂肪酸および ω -3 系脂肪酸に大別され、それぞれを代表するリノール酸および α リノレン酸は、生命維持に必須の脂肪酸である。1970 年代からの疫学調査において、アザラシなどの海棲哺乳類を主食とするグリーンランドの先住民族イヌイットは、心血管系疾患による死亡率がデンマークの白人と比較して有意に低いことやイヌイットの血中には魚やアザラシ由来の ω -3 系脂肪酸から合成される EPA が多く含まれていたことから、 ω -3 系脂肪酸が注目されはじめた(48-50)。これらの疫学調査から ω -3 脂肪酸を多く摂取することにより、心血管系疾患を予防できることが示唆された。さらに、 ω -3 系脂肪酸摂取量の減少や EPA/AA 比の低下が潰瘍性大腸炎やクローン病などの炎症性腸疾患、アルツハイマー病やうつ病などの中枢神経疾患の発症に関連があることが報告された(51-54)。以上のように、 ω -3 系脂肪酸は健康な状態を保つうえで重要であることが示されてきた。

炎症時、EPA は AA と同様に COX、Lipoxygenase (LOX) などの酸化酵素によって代謝され、PGE₃、レゾルビンやプロテクチンなどの抗炎症性エイコサノイドに変換される (Figure 1)。AA 由来 PGE₂ と同様に COX-2/PGES 経路により EPA から PGE₃ が産生されて、PGE₂ と EP 上で競合することで抗炎症作用や抗腫瘍作用を示す。PGE₃ のがん細胞に対する効果として、EP2、4 過剰発現腫がん細胞に対して細胞増殖抑制作用を示すことや、B16 メラノーマ細胞に対してアポトーシス促進作用を示すことが報告されている(55, 56)。さらに、 ω -3 系脂肪酸の抗腫瘍効果がみられた腫瘍組織において、PGE₂ 量の低下、PGE₃ 量の上昇が認められた(55-59) (Table 2)。

PGE₃ は PGE₂ と構造が類似していることから、細胞内から分泌されて EP に作用した細胞外の過剰な PGE₃ は細胞内に取込まれて素早く分解・代謝されると考えられている(3)。しかしながら、膜透過機構についての情報は乏しく、PGE₃ の膜透過性が生理活性に及ぼす影響についてはこれまで十分に考慮されないまま PGE₃ の生理作用が説明されてきた。現在のところ、PGE₃ の分泌過程に MRP4 が関与し、A549 細胞における MRP4 阻害剤および MRP4 ノックダウンの検討結果より PGE₃ の細胞外放出に MRP4 が 50%程度寄与することが報告されている(60)。

当研究室では、有機アニオン輸送体 OATPs が PGE₂ を輸送することを報告し(8)、その中でも PGE₂ に高い親和性を示す OATP2A1(6)に着目して研究を進めてきた。OATP2A1 は、PGE₂ と乳酸などのアニオン性化合物を交換する特性を持つ輸送体であり、*In vitro* 実験系において OATP2A1 は、PGE₂ の細胞内取込みおよび分泌に働くことがいわれている。細胞内に取込まれた PGE₂ は細胞質の代謝酵素 15-PGDH により 15-keto PGE₂ へ代謝されることで不活性化されることから、OATP2A1 は PGE₂ を細胞内へ取込むことで PGE₂ の不活性化に働

く(18)。一方、当研究室では炎症性刺激に応じた PGE₂ 分泌に OATP2A1 が関与することをヒト気道上皮細胞モデル BEAS-2B 細胞(61)、大腸がん細胞(62)、マウス腹腔 Mφ およびマウス Mφ モデル RAW264 細胞(44)で示してきた。細胞質に PGE₂ の代謝酵素が存在していることから、OATP2A1 の機能を抑制すると、PGE₂ の分泌が抑制されることで細胞質に残った PGE₂ が代謝酵素により不活性化されることが考えられる。OATP2A1 は PG 類を選択的に輸送することから、PGE₂ と構造が類似している EPA 由来 PGE₃ が OATP2A1 に認識されることが考えられる (Figure 2)。

そこで本章において、炎症時 PGE₂ および PGE₃ の組織分布における OATP2A1 の役割を検討することを目的に、まず OATP2A1 を含む PGE₂ 輸送体の PGE₃ に対する認識性を評価した。OATP2A1 は PGE₃ を認識したことから、PGE₂ および PGE₃ の組織分布における OATP2A1 の影響について、PGE₃ を検出できるまで上昇させる目的でマウスに PGE₃ の前駆体であるエイコサペンタエン酸エチルエステル (EPA-E) を WT と *Slco2a1*^{-/-}マウスに経口投与し、各組織 PGE₂、PGE₃ 量と血漿中濃度を測定して評価した。さらに、PGE₃ に対する OATP2A1 の輸送特性および OATP2A1 を介した PGE₃ の作用の検討から、生体内において PGE₃ が OATP2A1 を介した PGE₂ 動態・作用に与える影響を考察した。

Table 2 Effect of ω -3 fatty acids targeting 3-series PGs in cancer prevention.

Cancer type	Models	Cancer outcome	PGs
Colon	AOM/DSS induced fat-1 mice	Suppression of colorectal tumorigenesis	PGE ₂ ↓ PGE ₃ ↑ (Mucosa)
Lung	BALB/c athymic mice injected with A549 cells	Reduced tumor growth by 50-60% in A549 xenograft	PGE ₂ ↓ PGE ₃ ↑ (Tumor)
Breast	Fat-1 mice injected with E0771 cells	No palpable tumors in the fat-1 mice but 600 mm tumors in WT mice	PGE ₂ → PGD ₂ ↓ PGE ₃ ↑ (Tumor)
Melanoma	Fat-1 mice injected with B16 cells	Reduced incidence of tumor formation and tumor growth rate	PGE ₂ ↓ PGE ₃ ↑ (Tumor)
Pancreas	Nude mice injected with BxPC-3 cells	Tumor size reduced by 60%	PGE ₂ ↓ PGE ₃ ↑ (Tumor)

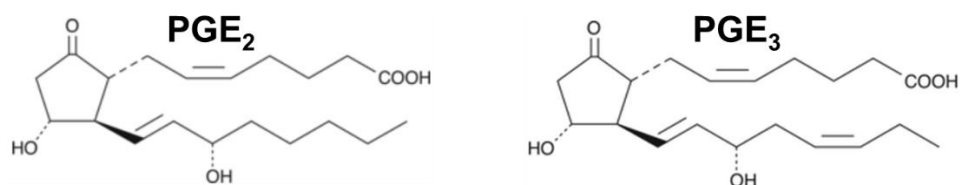


Figure 2 Structures of PGE₂ and PGE₃.

PGE₂ lacks a C-C double bond in the ω -chain of PGE₃.

第二節 実験方法

試薬

[³H]PGE₂ (163.6 Ci/mmol) および [³H]estrone-3-sulfate (45.6 Ci/mmol) は Perkin Elmer (Waltham, MA) から購入した。 [³H]p-Aminohippuric acid (3.75 Ci/mmol) および [¹⁴C]tetraethylammonium (55.4 mCi/mmol) は American Radiolabeled Chemicals (St. Louis, MO) から購入した。 PGE₃、PGE₂、d4-PGE₂、15-keto PGE₂、エイコサペンタエン酸 (EPA)、およびアラキドン酸 (AA) は Cayman Chemical (Ann Arbor, MI) から購入した。エイコサペンタエン酸エチルエステル (EPA-E) は陽進堂 (Toyama) から購入した。Lipopolysaccharide (LPS、*Escherichia coli* 0111:B4 由来) は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) から購入した。その他の試薬は市販される特級試薬を用いた。

細胞培養

ヒト OATP2A1、OATP1B1、OATP2B1、OAT1、OCT1、または OCT2 を発現させた HEK293 細胞 (HEK/2A1、/1B1、/2B1、/OAT1、/OCT1、/OCT2 細胞) および空ベクターを形質導入した Mock 細胞 (HEK/Mock 細胞) は当研究室で樹立した細胞株を用いた(63-66)。培養液には 10% (v/v) 牛胎児血清 (FBS) (Sigma-Aldrich、St. Louis, MO)、100 U/mL ベンジルペニシリン (Sigma-Aldrich、St. Louis, MO)、および 100 µg/mL ストレプトマイシン (Wako Pure Chemical Industries、Osaka) を含有した Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM、Wako Pure Chemical Industries、Osaka) を用いた。すべての細胞は 37°C、5% CO₂ 存在下インキュベーター内で培養した。

Phosphate buffered saline (PBS)

NaCl	137 mM
KCl	2.7 mM
KH ₂ PO ₄	1.5 mM
Na ₂ PO ₄	8.0 mM

adjusted to pH 7.4 with HCl

0.1% Trypsin

Trypsin (Wako Pure Chemical Industries)	1.0 g
EDTA	0.2 g
PBS	1000 mL

adjusted to pH 7.4 with HCl

実験動物

Slco2a1^{-/-} マウスは、Chang らの報告(33)を参考に、*Slco2a1* 遺伝子の exon1 領域を *LoxP* 配列で挟まれた *Slco2a1*^{fllox/+} を作出し、*Slco2a1*^{fllox/flox} と全身に Cre を発現する CAG-Cre mouse (*Slco2a1*^{+/+}, CAG-Cre) を交配させ、*Slco2a1*^{-/-} (mixed 129/B6 background) を作製した。21-24 週齢のメスマウスを実験に用いた。動物の取り扱いおよび飼育は、金沢大学動物実験指針 (Permit number、AP-132778、AP-143119、AP-153511) に従った。

輸送体過剰発現 HEK293 細胞を用いた取込み試験

Poly-L-Lysine (Sigma-Aldrich、St. Louis、MO) でコーティングした 24-well 培養プレート (Thermo Fisher Scientific、Waltham、MA) に 2×10^5 cells/well (4×10^5 cells/mL の細胞懸濁液を 500 μ L) 播種し、48 時間培養した。実験は 37°C に設定した恒温槽上で行った。まず、培地を吸引し、37°C に加温した 500 μ L の TB で 1 回洗浄し、TB を 500 μ L 加え 5 分間プレインキュベーションを行った。続いて TB を吸引除去し、0.6 nM [³H]PGE₂、0.01、0.02、0.05、0.1、0.2、0.5、1 μ M 非標識 PGE₂ または 0.1、0.2、0.5、1、2、5、10、80 μ M PGE₃ を含む 200 μ L の TB を加え反応を開始した。反応薬液の初期濃度を測定するため、直ちに 20 μ L を採取した。一定時間経過後、氷冷した TB 1 mL で 2 回洗浄することにより反応を停止させた。

[³H]PGE₂ 取込み反応終了後、1 N NaOH を 250 μ L 加え細胞を 1 時間可溶化し、1 N HCl 250 μ L で中和した。細胞溶解液の放射能を液体シンチレーションカウンター LSC-6100 (Hitachi-Aloka Medical、Tokyo) により定量した。細胞タンパク質量は Lowry 法(67)に従い、BSA を検量線として定量した。取込みクリアランスは cell-to-medium (C/M) ratio (μ L/mg protein) で示した。

非標識 PGE₂、または非標識 PGE₃ 取込み反応終了後、ジブチルヒドロキシトルエン (BHT) (w/v 1%) および内標準物質である d4-PGE₂ を含む 70 % (v/v) アセトニトリル水溶液を well に 500 μ L 加え、タンパク質を変性させた後、マイクロピペットで、遠心チューブに回収した。再び well に 70 % (v/v) アセトニトリル水溶液を 500 μ L 加え同様の操作を繰り返した。回収したサンプルを 15,000 rpm (CF15RX; Hitachi Koki Co.、Tokyo)、10 min、4 °C で遠心した。遠心後、上清を新しい遠心チューブに移し、減圧乾燥装置 Savant™ SPD2010 (Thermo Fisher Scientific、Waltham、MA) を用いて蒸発乾固させ、80 μ L 0.1% (v/v) ギ酸水溶液/アセトニトリル (1:1、v/v) で再溶解し、LC-MS/MS 測定用試料とした。

Transport buffer (TB)

NaCl	125 mM
KCl	4.8 mM
CaCl ₂	1.2 mM
KH ₂ PO ₄	1.2 mM
MgSO ₄	1.2 mM
HEPES	25 mM

D-Glucose 5.6 mM

adjusted to pH 7.4 with HCl

ヒト MRP4 発現膜ベシクルを用いた取込み試験

MRP4 を発現させた Sf9 細胞より調製された hMRP4 発現ベシクルは GenoMembrane Co. (Kanagawa) より購入した。5 mg protein/mL の発現膜ベシクル懸濁液 4 μ L (20 μ g protein) に reaction buffer 15.6 μ L を加えて 37°C で 5 分間プレインキュベーションし、PGE₂ または PGE₃ を含む ATP (または AMP) 含有 assay mix buffer を 20.4 μ L 加え、1 μ M PGE₂ または PGE₃ の取込み反応を開始した。一定時間後に氷冷した stop buffer 1 mL を加えて反応停止させ、メンブレンフィルター (HAWP02500、pore size 0.45 μ m、Merck Millipore、Darmstadt、Germany) で迅速濾過し、1 mL の氷冷した stop buffer で 3 回洗浄した。

[³H]PGE₂ 取込み反応終了後、クリアゾル I (Nacalai Tesque、Kyoto) を加え、メンブレンフィルター上の放射能を液体シンチレーションカウンター LSC-6100 (Hitachi-Aloka Medical、Tokyo) により定量した。

非標識 PGE₃ 取込み反応終了後、フィルターを遠心チューブに移し、内標準物質である d4-PGE₂ を含むメタノールを 1 mL 加え、激しく攪拌し、遠心 (15,000 rpm、15 min、4°C) した。上清 900 μ L を新しい遠心チューブに移し、減圧乾燥装置 Savant™ SPD2010 (Thermo Fisher Scientific、Waltham、MA) を用いて蒸発乾固させ、0.1% (v/v) ギ酸水溶液/アセトニトリル (1:1、v/v) で再溶解し、LC-MS/MS 用測定試料とした。

Reaction buffer

MOPS-Tris	50 mM
KCl	70 mM
MgCl ₂	7.5 mM

Assay mix buffer

MgATP or MgAMP	7.8 mM
PGE ₂ or PGE ₃	2.0 μ M
Glutathione	3.9 mM

Stop buffer

MOPS-Tris	50 mM
KCl	70 mM

EPA-E 投与炎症モデルマウスの作製

PGE₃ の前駆体である 1000 mg/kg EPA-E を経口投与し(63)、2 時間後、炎症を誘発させる

目的で 7.5 mg/kg LPS を腹腔内投与した。EPA-E 投与 8 時間後、血漿および各組織を採取した。

各組織の採取

ペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg body weight) の腹腔内投与により麻酔した後、開腹および開胸し、下大静脈と心臓をそれぞれ露出させた。5,000 units/5 mL ヘパリンを通したシリンジを用いて心採血を行い、得られた血液を遠心 (1,300×g、10 min、4°C) 後、上清を血漿として採取した。心採血後は速やかに下大静脈を切開し、マウス各組織 (肺、大腸、胃、腎臓、肝臓、脾臓) を摘出し、氷冷した 100 μM インドメタシン/PBS 中で洗浄し、質重量として約 100 mg 程度に組織を採取した。採取された組織はマイクロチューブに回収し、液体窒素により瞬間凍結させた。使用するまでの間、血漿および各組織は -80°C で保存した。

組織からの PGE₂、PGE₃ 抽出

各組織片の重量を測定した。その後、15 mL チューブに各組織を入れ homogenize buffer を 2.7 mL ずつ添加した。ホモジナイザー T 25 digital ULTRA-TURRAX® (IKA、Staufen、Germany) により各組織を機械的に破砕し、超音波処理 (Microson XL2000; Misonix、Farmingdale、NY) を行った。遠心 (2,000 rpm、10 min、4°C) により残存した組織断片を除去し、上清をガラス製コニカルチューブに回収した。ヘキサンを 2 mL 添加し、4 分間混合後に遠心 (2,000 rpm、10 min、4°C) し、上清を捨てた。その後、ギ酸水溶液 (終濃度 0.1% (v/v)) および 2 mL クロロホルムを添加し、4 分間激しく混合し、遠心 (2,000 rpm、10 min、4°C) を行った。上層、中間層を取り除いた後、減圧乾燥装置 Savant™ SPD2010 (Thermo Fisher Scientific、Waltham、MA) により蒸発乾固した。0.1% (v/v) ギ酸水溶液/アセトニトリル (1:1、v/v) 200 μL に再構築し、HLC-DISK™ 3 TCI (Pore size 0.45 μL、水溶系; Kanto Chemical Co.、Tokyo) に通した後、100 μL を採取して LC-MS/MS 用測定試料とした。

Homogenize buffer

Aceton/PBS (1:1)	2.7 mL
100 mM Indomethacin/methanol	2.7 μL
100 ng/mL PGE ₂ -d ₄ /methanol	5 μL
1% BHT/methanol	13.5 μL

LC-MS/MS による定量

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は、液相ポンプに LC-20AD、オートサンプラーに SIL-20AC (Shimadzu Corporation、Kyoto) を用いた。カラムは Mercury MS (C18、20×4.0 mm、Luna 3 μm; Phenomenex、Torrance、CA) を用いて、0.1% (v/v) ギ酸水溶液 (A) とアセト

ニトリル (B) で移動相を構成したグラジエント法により分析した。グラジエントの組成は、25-99% B (0-5 min)、99% B (5-7 min)、95-25% B (7-9 min) として、流速は 0.3mL/min、注入量は 30 μ L とした。

質量分析器 (MS) は、API3200™ triple quadrupole mass spectrometer (AB Sciex, Foster City, CA) を使用し、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法 (Polarity: negative) によって分析した。PGE₃ の Q1/Q3 (m/z) は 349.2/269.2、PGE₂ は 351.1/71.1、15-keto PGE₂ は 349.2 /331.2、EPA は 301.2/257.1、AA は 303.2/58.9、内標準である d4-PGE₂ は 355.1/275.2 で測定した。マススペクトルは、Analyst® 1.6 Software で解析した。

各組織からの RNA 抽出および qRT-PCR

各組織から RNAiso plus (Takara Bio Inc., Shiga) を用いて total RNA を抽出した。得られた total RNA を M-MLV Reverse Transcriptase (Promega Corporation, Madison, WI) で逆転写反応し cDNA を調製後、特異的なプライマーとして、Cox-2 Forward:5'-ATGAGTACCGCAAACGCTTC-3'、Reverse:5'-TCTGGACGAGGTTTTTCCAC-3'、および Hprt Forward:5'-CGCAGTCCCAGCGTCGTGATT-3'、Reverse:5'-CTTGAGCACACAGAGGGCCACCA-3'、を用いて評価した。各組織における Cox-2 mRNA 発現の定量は、Brilliant III Ultra Fast SYBR Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) を使用し qPCR により行った。PCR 反応は、denature (95°C、10 sec)、annealing (60°C、11 sec)、extension (72°C、10 sec) を 1 サイクルとして 40 サイクル行った。内標準として、hypoxanthine phosphoribosyltransferase (Hprt) を用い、 $\Delta\Delta C_t$ 法によって相対的に定量した(68)。

細胞増殖試験 (SRB Assay)

Lovo 細胞を 4×10^3 cells/well となるように 96 well プレートに播種した。接着後、0.01、0.1、1 μ M PGE₃ または PGE₂ を含む培地を添加し、増殖試験を開始した。24 時間後に細胞を固定化し、スルホローダミン B (SRB) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) で染色し、比色定量によって評価した。細胞の固定は培地 100 μ L につき 50 % (w/v) トリクロロ酢酸を 25 μ L ずつ加え、氷上で 1 時間静置した。水で 4 回洗い、ドラフトチャンバー内で乾燥させた後、1% (v/v) 酢酸水溶液で 0.057% に調製した SRB 溶液を 100 μ L ずつ加え、30 分間室温で静置した。染色終了後、1% (v/v) 酢酸水溶液で 5 回洗い、再びドラフトチャンバー内で乾燥させた。10 mM Tris (pH 10.0) を 100 μ L 加えて色素を溶かし、マイクロプレートリーダー (ARBO™X3, PerkinElmer, Waltham, MA) を用いて 520 nm の吸光度を測定した。

HEK293 細胞からの RNA 抽出および qRT-PCR

10 μ M PGE₃ を含む培地を 24 時間処置した HEK/Mock および HEK/2A1 細胞から RNAiso plus (Takara Bio Inc., Shiga) を用いて total RNA を抽出した。得られた total RNA を M-MLV

Reverse Transcriptase (Promega Corporation, Madison, WI) で逆転写反応し cDNA を調製後、特異的なプライマー VEGF Forward:5'-CAGAGCGGAGAAAGCATTTG-3'、Reverse:5'-GCGTGGTTTCTGTATCGATC-3'、および HPRT Forward:5'-TGACACTGGCAAAACAATGCA-3'、Reverse:5'-GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT-3' を用いて評価した。

データ解析

取込み活性は、HEK293 細胞に取り込まれた基質量 (pmol/mg protein or dpm/mg protein) を反応液中基質濃度 (μmol/L or dpm/μL) で除した cell-to-medium (C/M) ratio (μL/mg protein) で示した。OATP2A1 を介した PGE₃ および PGE₂ の輸送の kinetic parameter の算出は、MULTI プログラムを用いて以下の式より算出した。

$$V = \frac{V_{\max} \times S}{K_m + S}$$

ここで、 V は取込み速度 (pmol/mg protein/10 sec)、 S は基質の初期濃度、 V_{\max} は最大取込み速度、 K_m はミカエリスメンテン定数 (μM) とした。

OATP2A1 による PGE₃ および PGE₂ 輸送は互いに競合的に阻害されるとし、 K_i を IC_{50} (μM) で代用し、以下の式から MULTI プログラム(69)を用いて算出した。

$$\% of control = 100 \times \left(1 - \frac{I}{IC_{50} + I} \right)$$

ここで、% of Control は阻害剤非存在下における基質の取込み速度を 100 とした時の阻害剤存在時の基質取込み速度比、 I は阻害剤の濃度 (μM) とした。

統計学的解析は、Student's t-test を用いた。いずれも、 $p < 0.05$ の時に統計的に有意な差があると判断した。

第三節 実験結果

OATP2A1、OATP1B1、OATP2B1、OAT1、OCT1、OCT2 の輸送活性の評価

PGE₂ を輸送するヒト SLC 輸送体は PGE₃ の膜透過に関与するか検討を行うため、まず、OATP2A1 の活性を [³H]PGE₂、OATP1B1 または OATP2B1 の活性を [³H]estrone-3-sulfate、OAT1 の活性を [³H]PAH、OCT1 または OCT2 の活性を [¹⁴C]TEA を用いて確認した。取込み試験は、HEK/2A1、/1B1、/2B1、/OAT1、/OCT1、/OCT2 細胞を用いて行った。取込み試験の結果、各輸送体発現細胞において有意な取込み活性が確認された (Figure 3)。

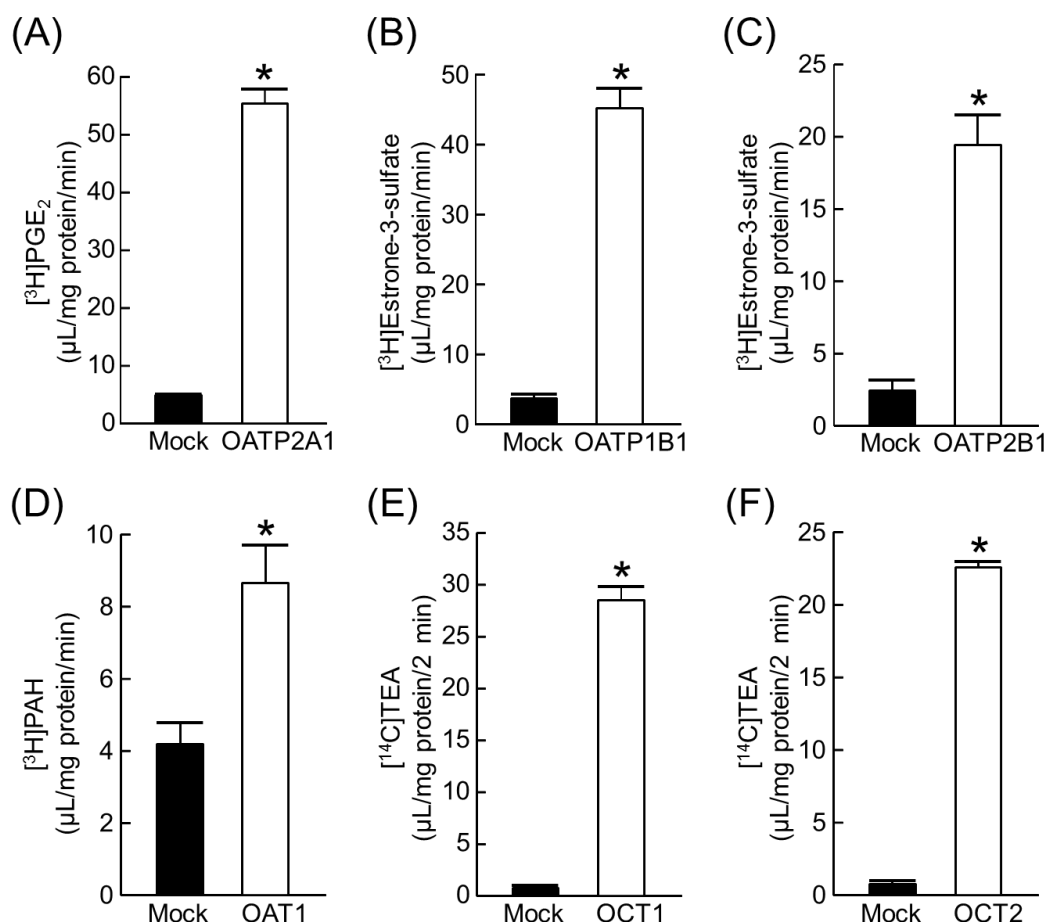


Figure 3 Uptake activity of transporter-expressing HEK293 cell lines.

Transport activity of HEK293 cells expressing OATP2A1 (A), OATP1B1 (B), OATP2B1 (C), OAT1 (D), OCT1 (E), and OCT2 (F) towards typical substrates. [³H]PGE₂ (0.6 nM), [³H]estrone-3-sulfate (4.3 nM), [³H]p-aminohippuric acid (PAH) (1.3 nM) and [¹⁴C]tetraethylammonium (TEA) (1.0 nM) were used as substrates to measure transport activity of OATP2A1, OATP2B1, OATP1B1, OAT1, OCT1, and OCT2, respectively. Each bar represents the mean + S.E.M. (n = 3-4). *, significantly different from Mock cells by Student's t-test ($p < 0.05$).

OATP2A1、OATP1B1、OATP2B1、OAT1、OCT1、OCT2 の PGE₃ 認識性

各輸送体の活性が確認できたことから、次に、各輸送体の PGE₃ 取込みを測定した。その結果、HEK/2A1 および HEK/1B1 細胞では、1 分における PGE₃ 取込み活性は Mock 細胞と比較してそれぞれ 12 倍および 1.5 倍有意に高い値が得られた (Figure 4A、B)。

OATP2A1 は OATP1B1 の 8 倍高い取込み活性がみられ、PGE₃ 取込み活性は 1 分まで直線性が観察された。したがって、初期取込み時間として 10 sec で以後検討を行った。以上の結果から、OATP2A1 および OATP1B1 は PGE₃ を輸送することが示された。一方、他の輸送体においては Mock 細胞との有意な差は観察されなかった (Figure 4 C-F)。

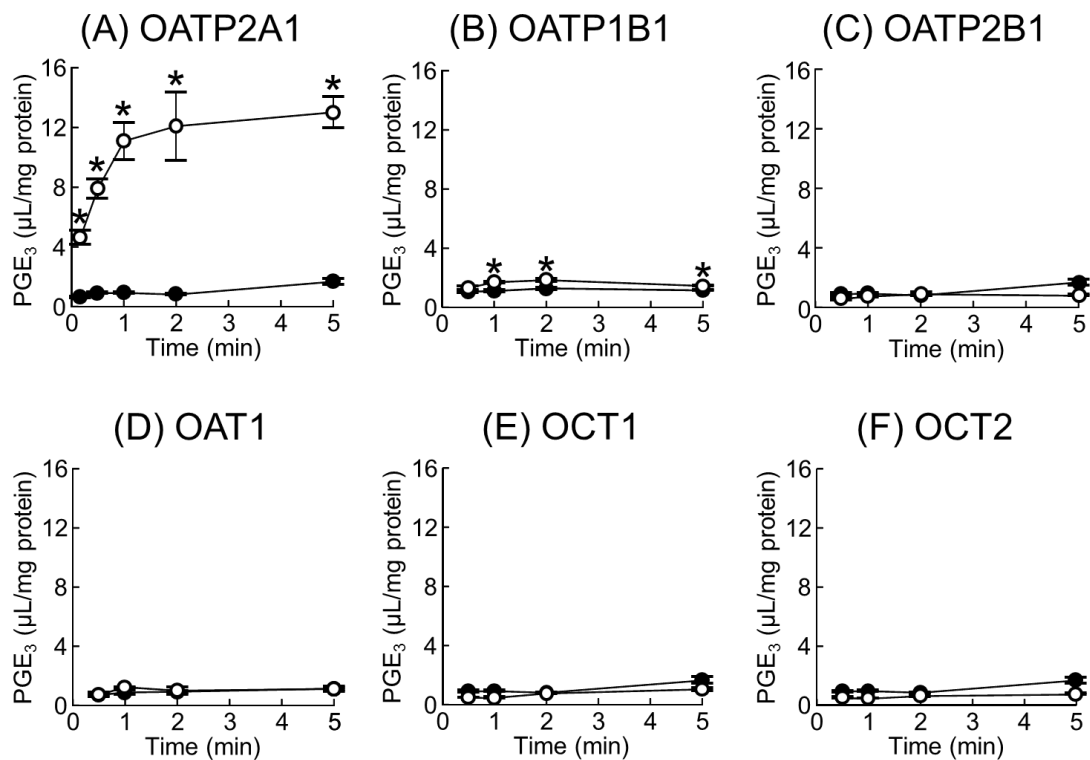


Figure 4 Time courses of PGE₃ uptake by HEK293 cells expressing various transporters.

Uptake of PGE₃ by HEK/2A1 (A), HEK/1B1 (B), HEK/2B1 (C), HEK/OAT1 (D), HEK/OCT1 (E) and HEK/OCT2 cells (F) was measured (open symbol), and compared with that by Mock-transfected cells (filled symbols) in transport medium containing 0.5 μM PGE₃ at 37°C up to 5 min. Each point represents the mean \pm S.E.M. ($n = 3-4$). *, significantly different from Mock cells by Student's t-test ($p < 0.05$).

MRP4 による PGE₃ 輸送

PGE₃ の分泌に関与する輸送体として、MRP4 を検討した。MRP4 発現膜ベシクルを用いて PGE₂ および PGE₃ 取込み試験を行った。ATP 存在下での PGE₂ 取込み活性は、AMP 存在下と比較して約 4 倍有意な高値を示した(Figure 5A)。ATP 存在下における 1、2 分後の PGE₃ 取込みは、AMP 存在下に比べて有意に高かった (Figure 5B)。5 分後の PGE₃ 取込みに変化がなかったことに関して、ATP が枯渇したことが考えられる。したがって、PGE₃ の分泌過程に MRP4 の関与が示唆された。

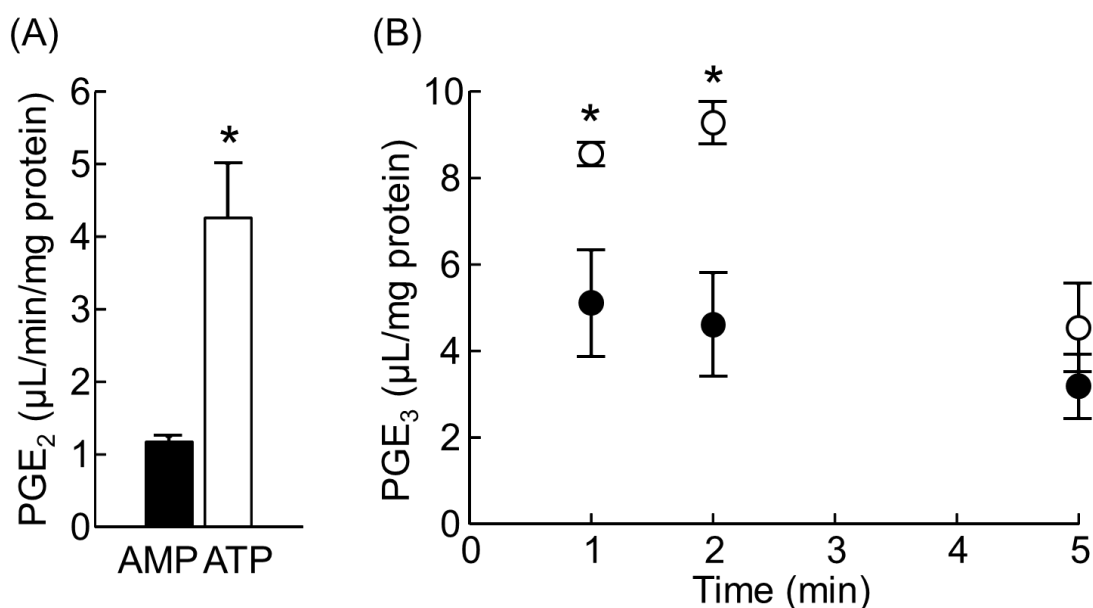


Figure 5 Uptake of PGE₂ and PGE₃ by MRP4-expressing membrane vesicles.

Uptake of PGE₂ (1 μM) and PGE₃ (1 μM) by human MRP4-expressing membrane vesicles was measured at 37°C in the presence of ATP (open column, open symbol) or AMP (closed column, filled symbol). Uptake time of PGE₂ (A) was 1 min and PGE₃ (B) was 1, 2, and 5 min.

ATP-dependent uptake was obtained by subtracting PGE₂ or PGE₃ uptake in the presence of AMP from that in the presence of ATP. Each point represents the mean ± S.E.M. (n = 4). *, significantly different in the presence of AMP by Student's t-test ($p < 0.05$).

OATP2A1 を介した PGE₃ および PGE₂ の濃度依存性

OATP2A1 による PGE₃ 輸送特性をより詳細に評価した。初期取込み時間として 10 sec で PGE₃ および PGE₂ の濃度依存性試験を行った。その結果、HEK/2A1 細胞における PGE₃ 取込みに飽和性が観察され、 $K_m = 7.202 \pm 0.595 \mu\text{M}$ 、 $V_{max} = 26.824 \pm 1.711 \text{ pmol/10 sec/mg protein}$ と算出された (Figure 6A)。Eadie-Hofstee plot において、PGE₃ は 80 μM まで直線性が観察され、一相性を示したことから、OATP2A1 を介した PGE₃ 取込みは単一の結合サイトであることが示唆された (Figure 6A inset)。

また、PGE₂ 取込みにおいても飽和性が観察され、 $K_m = 0.331 \pm 0.131 \mu\text{M}$ 、 $V_{max} = 7.21 \pm 1.14 \text{ pmol/10 sec/mg protein}$ と算出され、Eadie-Hofstee plot より PGE₂ は 1 μM まで直線性が観察された (Figure 6B)。なお、今回求められた PGE₂ の K_m 値は過去の報告されている OATP2A1 の $K_m = 0.11 \mu\text{M}$ と比較して 3 倍高い値であった(7)。

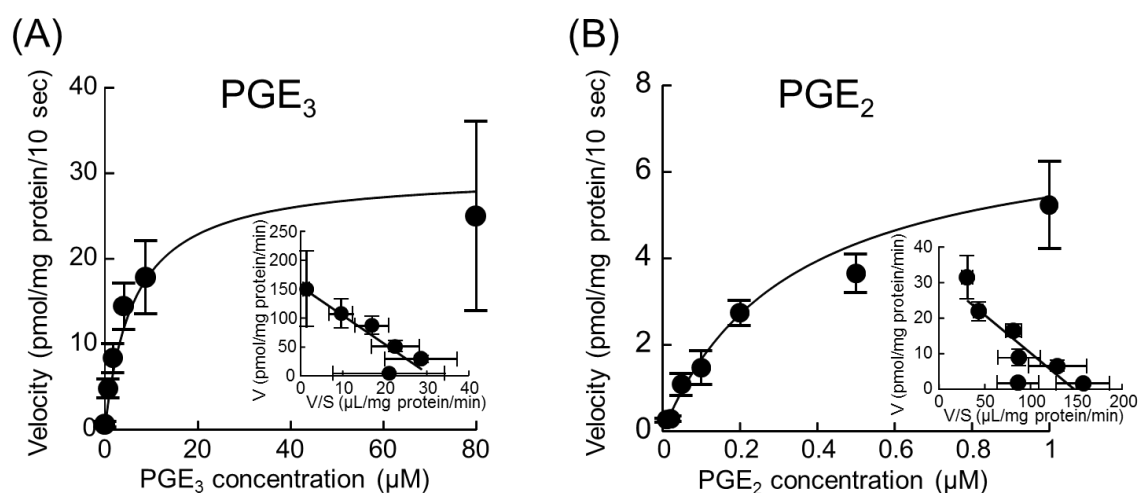


Figure 6 Saturation kinetics in PGE₂ and PGE₃ uptake by HEK/2A1 cells.

Concentration-dependent uptake of PGE₃ (A) and PGE₂ (B) by HEK/2A1 cells and mutual inhibition of PGE₂ and PGE₃ (C). (A and B) HEK/2A1 cells were incubated with various initial extracellular concentrations of PGE₃ (0.2, 1, 2, 5, 10, and 80 μM) or PGE₂ (0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 and 1 μM) at 37°C for 10 sec. Uptake rate was calculated by subtracting intracellular accumulation of test substrate in HEK/Mock cells from that in HEK/2A1 cells. Eadie-Hofstee plot analysis was performed. K_m and V_{max} values were obtained from at least three individual experiments, and are expressed as the average with S.E.M. *, significantly different from the control uptake by Student's t-test ($p < 0.05$). Each value represents the mean \pm S.E.M. (n = 3-4).

OATP2A1 を介した PGE₃ および PGE₂ 輸送の相互作用

OATP2A1 を介した PGE₃ と PGE₂ の相互作用を評価するため、PGE₃ または PGE₂ の濃度を 0.01、0.1、1、10 μ M として、PGE₂ と PGE₃ 間で相互阻害試験を行った。その結果、PGE₂ の取込みに対して PGE₃ の濃度依存的な阻害が観察され、10 μ M PGE₃ では 7% まで PGE₂ の取込みが低下した (Figure 7)。同様に PGE₃ の取込みに対して PGE₂ の濃度依存的な阻害が観察された。 IC_{50} を算出した結果、PGE₃ は 0.590 μ M、PGE₂ は 0.123 μ M であった。したがって、PGE₃ と PGE₂ は OATP2A1 上で相互作用することが示唆された。

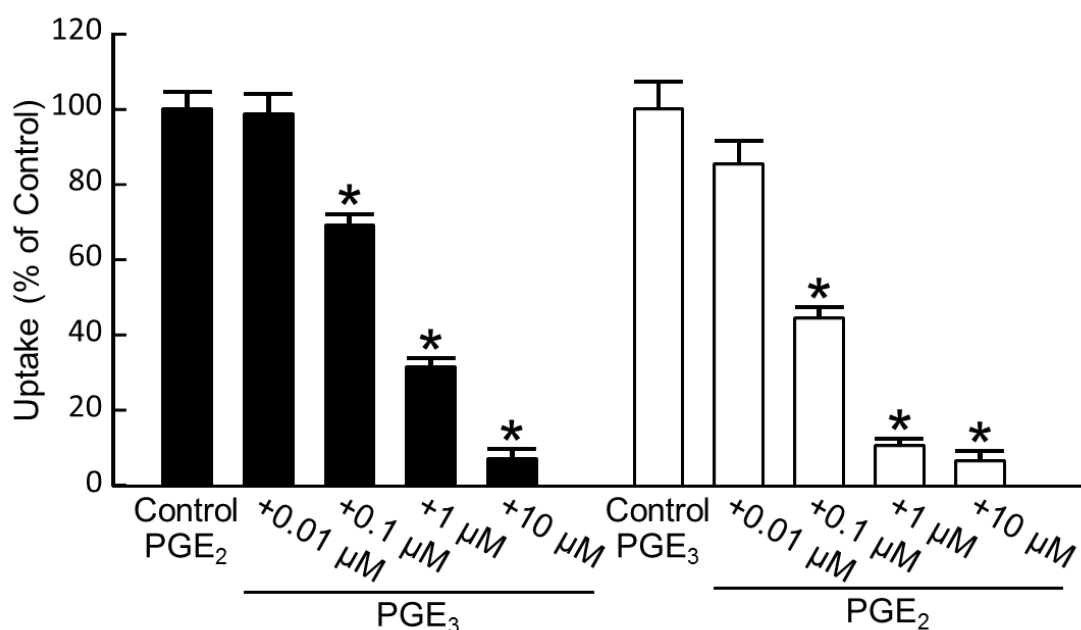


Figure 7 Mutual inhibition in PGE₂ and PGE₃ uptake by HEK/2A1 cells.

Mutual inhibition of PGE₂ and PGE₃. Inhibition of OATP2A1-mediated PGE₂ (0.6 nM) or PGE₃ (0.1 μ M) uptake by PGE₃ (0.01, 0.1, 1, 10 μ M) or PGE₂ (0.01, 0.1, 1, 10 μ M). Transport is expressed as percent of uptake in the absence of inhibitor. *, significantly different from the control uptake by Student's t-test ($p < 0.05$). Each value represents the mean + S.E.M. (n = 3-4).

LPS/EPA-E 投与 *Slco2a1* 欠損マウスの各組織 PGE₃ および PGE₂ の定量

各輸送体の中で OATP2A1 は最も高い PGE₃ 輸送活性を示し (Figure 4)、PGE₂ と PGE₃ が OATP2A1 を介して相互作用したことから (Figure 7)、マウスに EPA-E を投与することで産生される PGE₃ の組織量を OATP2A1 は調節すると仮説を立てた。*Slco2a1* 欠損による各組織における PGE₃ および PGE₂ 量の変化を評価するため、腹腔内に LPS を投与することで COX-2 を誘導させた後、PGE₃ の前駆体である EPA-E をマウスに経口投与し、肺、大腸、胃、腎臓、肝臓、脾臓の PGE₃ および PGE₂ 量を LC-MS/MS により定量した。WT マウスの各組織のうち、脾臓で PGE₃ および PGE₂ 量が最も高値を示した (Figure 8)。WT マウスと比較して *Slco2a1*^{-/-} マウスの肺、大腸、胃、腎臓において PGE₃ および PGE₂ 量が増加する傾向がみられ、肺では有意な高値を示した。一方、肝臓、脾臓において PGE₃ および PGE₂ 量の低下傾向がみられた。WT と *Slco2a1*^{-/-} マウスの血漿中 PGE₃、PGE₂ は検出限界以下であった。

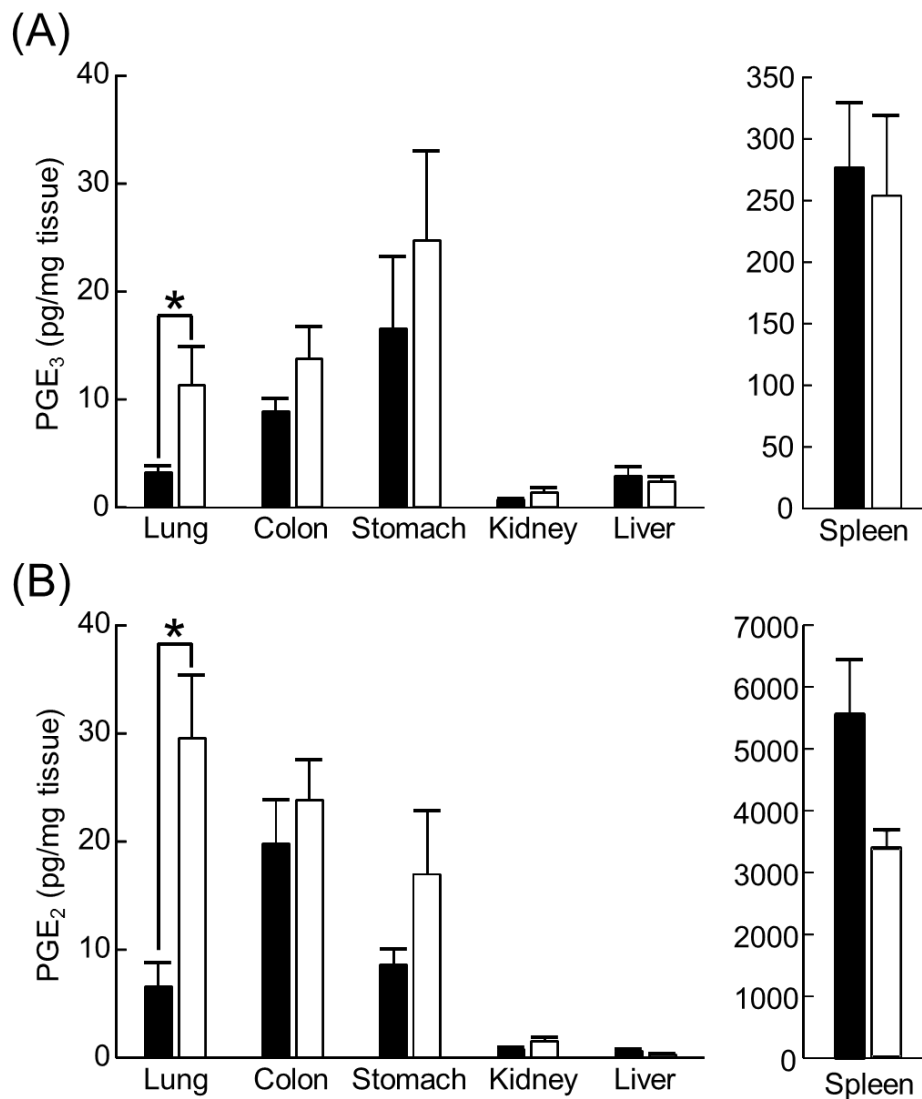


Figure 8 Tissue disposition of PGE₃ and PGE₂ in *Slco2a1*^{-/-} mice.

At 2 hours after oral administration of EPA-E at a dose of 1,000 mg/kg by gavage, the animals underwent intraperitoneal injection of LPS at a dose of 7.5 mg/kg as a COX-2 inducer. At 8 hours after administration of EPA-E, PGE₃ (A) and PGE₂ (B) concentrations in lung, colon, stomach, kidney, liver and spleen were determined by LC-MS/MS in WT (closed column) and *Slco2a1*^{-/-} (open column) mice. Tissue concentration was normalized by wet weight of tissue. Each bar represents the mean + S.E.M. (n = 3-5). *, significantly different from WT mice by Student's t-test ($p < 0.05$).

WT と *Slco2a1*^{-/-}マウスで観測された組織 PGE₃、PGE₂ 量は、これら前駆体の AA および EPA の組織量に比例していないか検討するため、PGE₃ を EPA で、PGE₂ を AA で除した値を算出した。*Slco2a1*^{-/-}マウスの肺における PGE₃/EPA および PGE₂/AA 比は、WT マウスと比較し増加したが、脾臓で低下する傾向がより顕著に観察された (Figure 9)。さらに、*Slco2a1*^{-/-}マウスの大腸、胃、腎臓においては、PGE₃/EPA および PGE₂/AA の比がわずかに上昇する傾向があったが、いずれにも統計学的有意差は認められなかった。

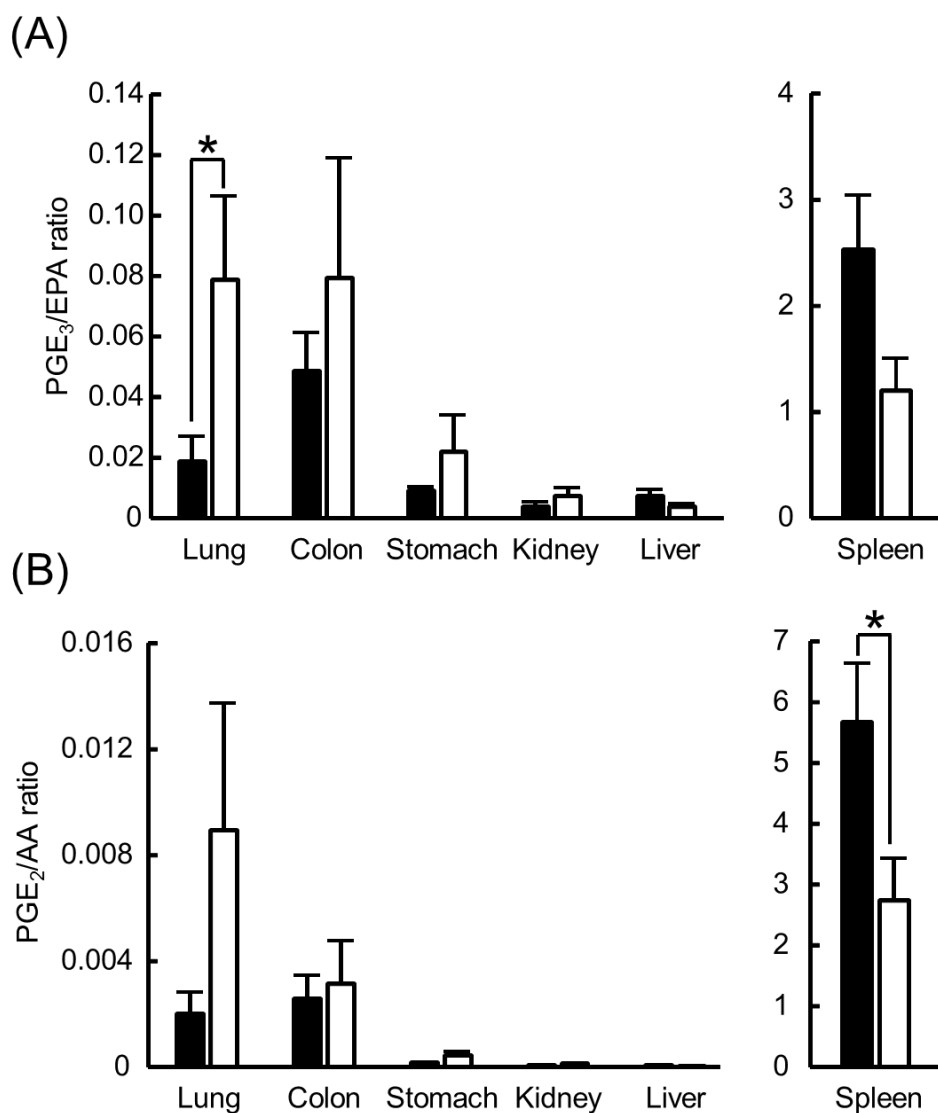


Figure 9 PGE₃ over EPA and PGE₂ over AA concentration rations in various mouse tissues.

The ratio of PGE₃ to EPA concentration (A) and PGE₂ to AA concentration (B) in each tissue was calculated based on the values obtained in WT (closed column) and *Slco2a1*^{-/-} (open column) mice. Each bar represents the mean + S.E.M. (n = 3-5). *, significantly different from WT mice by Student's t-test ($p < 0.05$).

細胞形質膜に発現する OATP2A1 は PGE_2 を細胞内へ取り込むことで、 PGE_2 の代謝に働く。しかし、 PGE_3 の代謝物に関しては、未だ同定されていないため、*Slco2a1* 欠損による PGE_3 代謝への影響を PGE_2 の代謝物 15-keto PGE_2 を測定することで代用した (Figure 10)。15-keto PGE_2 を PGE_2 で除した値を算出した結果、*Slco2a1*^{-/-}マウスの肺、大腸において、有意な低下がみられた。一方、脾臓を含む他の組織においては、有意な差が観察されなかった。したがって、肺、大腸において、*Slco2a1* 欠損により PGE_2 および PGE_3 代謝が低下していることが示唆された。

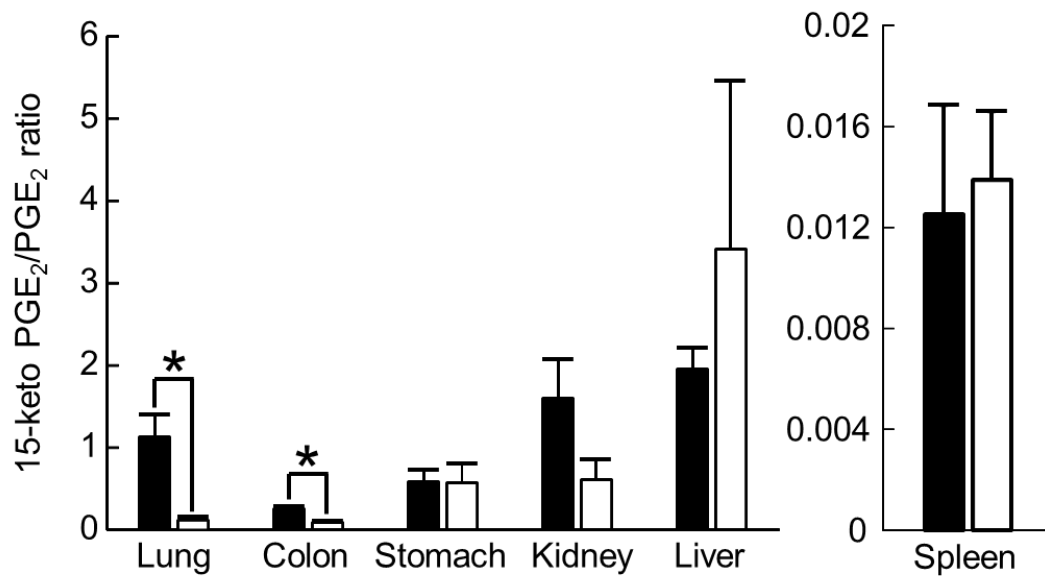


Figure 10 The ratio of 15-keto PGE_2 over PGE_2 concentration in various mouse tissues.

The ratio of 15-keto PGE_2 over PGE_2 concentration in each tissue was calculated based on the values obtained in WT (closed column) and *Slco2a1*^{-/-} (open column) mice. Each bar represents the mean + S.E.M. (n = 3-5). *, significantly different from WT mice by Student's t-test ($p < 0.05$).

LPS/EPA-E 投与 *Slco2a1* 欠損マウスの各組織の Cox-2 mRNA 発現

炎症刺激により誘導される PGE₂、PGE₃ 合成酵素 Cox-2 の mRNA 発現に対する *Slco2a1* 欠損の影響を評価するため、肺、大腸、胃、腎臓、肝臓、脾臓における Cox-2 の mRNA 量を評価した。その結果、WT と *Slco2a1*^{-/-}マウスの各組織における Cox-2 mRNA 発現量に変化はみられなかった (Figure 11)。

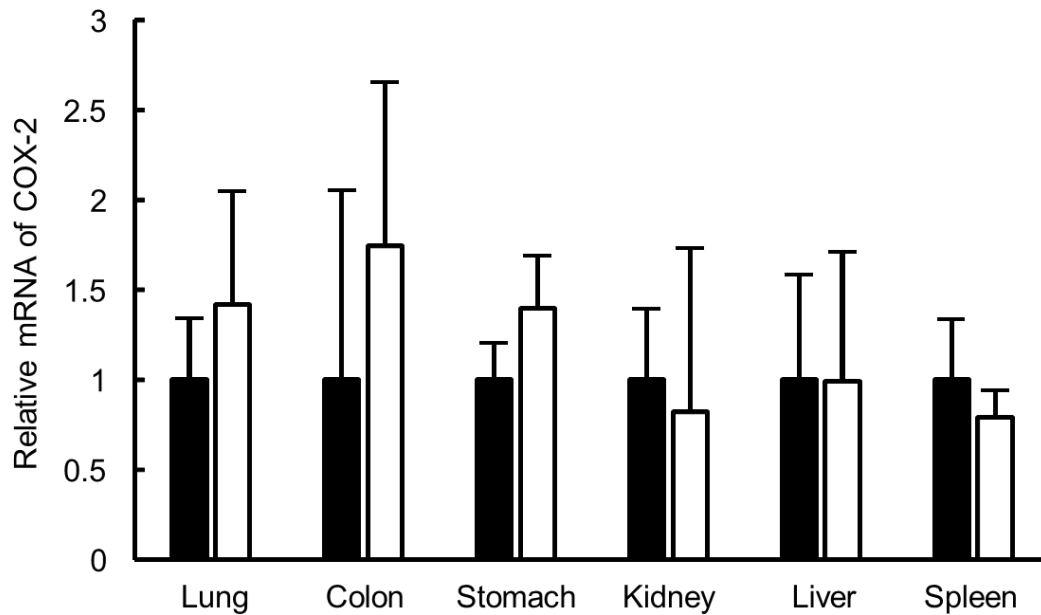


Figure 11 Cox-2 mRNA expression in various tissues.

Cox-2 mRNA expression was measured in the lung, colon, stomach, kidney, liver and spleen using gene-specific primers for mouse Cox-2. Each bar of WT (closed column) or *Slco2a1*^{-/-} (open column) mice represents the mean + S.E.M. (n = 3-5).

細胞増殖における PGE₃ の効果

PGE₂ が EP2 または EP4 に作用することでがん細胞の増殖は促進される一方、PGE₃ は EP2 または EP4 への作用により増殖抑制作用を示すことが報告されている(56)。ヒト大腸がん由来 Lovo 細胞において、PGE₃ は PGE₂ による EP を介した cAMP の上昇を抑制することから(70)、Lovo 細胞に対する PGE₃ の増殖抑制効果を検討した。0.01、0.1、1 μ M PGE₂ および PGE₃ を処置した結果、未処置群と比較して有意な差はみられず、PGE₂ の増殖促進作用および PGE₃ の増殖抑制作用は得られなかった (Figure 12)。

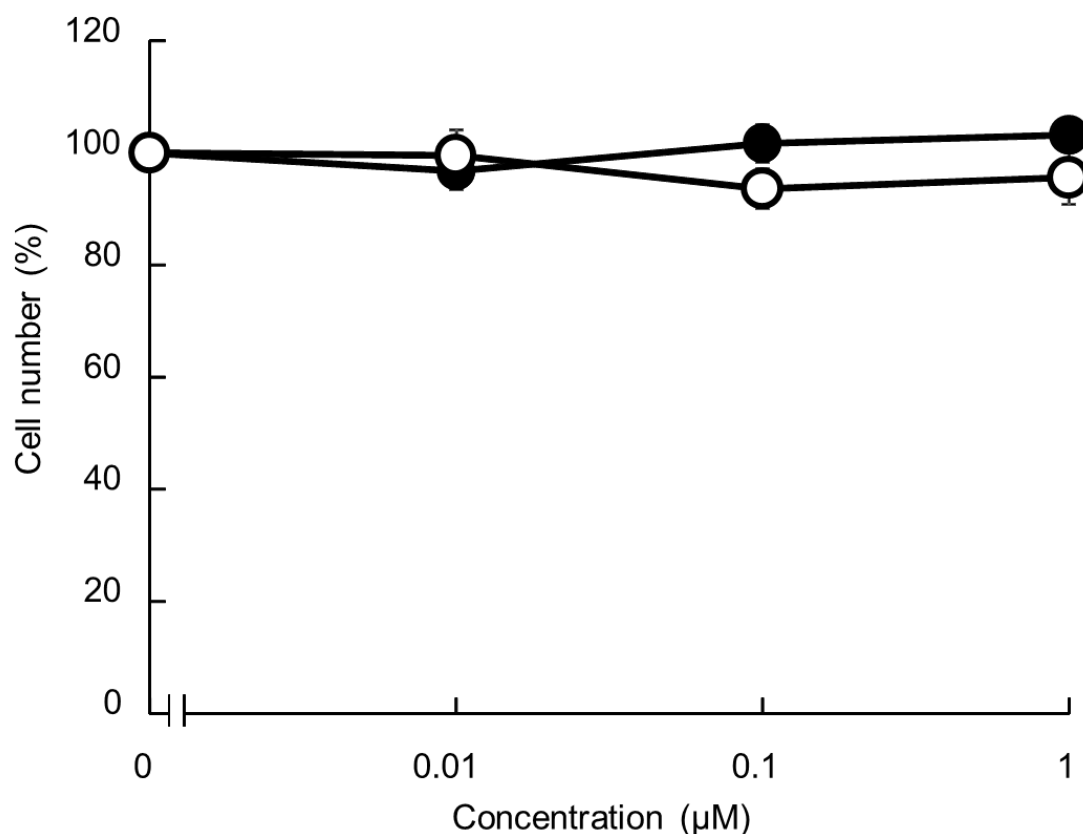


Figure 12 Effect of PGE₃ or PGE₂ on cell proliferation in Lovo cells.

Lovo cells were treated with PGE₃ (open symbol) or PGE₂ (filled symbol) (0.01, 0.1, or 1 μ M) for 24 hours. Growth of Lovo cells were monitored by means of SRB assay. Each value represents the mean \pm S.E.M. (n = 3).

PGE₃ 処置による VEGF mRNA 発現量の変化における OATP2A1 の影響

Lovo 細胞の増殖に対する PGE₃ の作用を評価したが変化がみられなかったため、次に細胞増殖に関わる因子 VEGF に対する PGE₃ の作用を評価した。PGE₃ の作用における OATP2A1 の影響を評価するため、HEK/2A1 および HEK/Mock 細胞を用いて、PGE₃ 処置による VEGF mRNA 発現量の変動を RT-PCR により比較した。PGE₃ 処置により HEK/Mock 細胞の細胞増殖因子 VEGF の発現は変化しなかった (Figure 13)。HEK/2A1 細胞では、10 μ M PGE₃ 処置により VEGF mRNA 発現量は約 20%減少したが、有意な差はみられなかった。

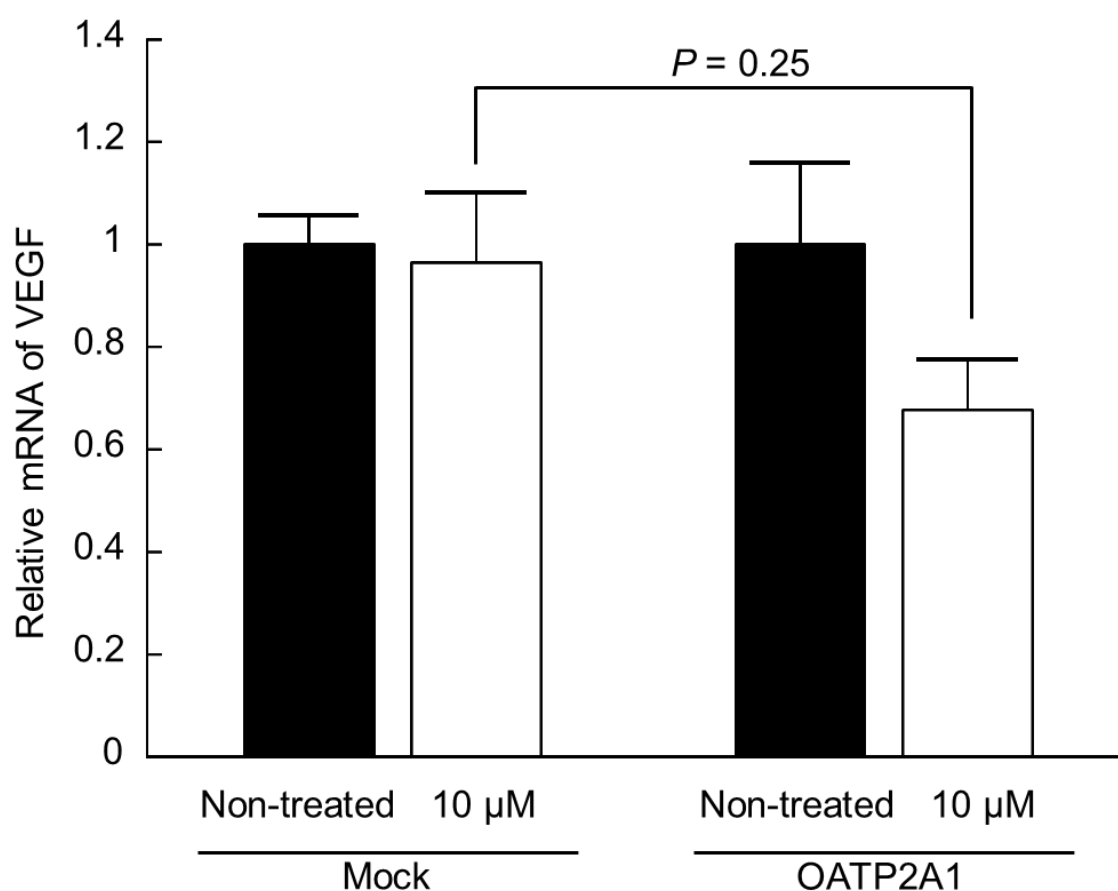


Figure 13 Effect of PGE₃ on VEGF mRNA expression in HEK293 cells.

mRNA expression of VEGF was determined by qRT-PCR in HEK/Mock or HEK/2A1 cells treated with 10 μ M PGE₃ for 24 hours. Each column represents the mean + S.E.M. (n = 3). Student's t-test was used for statistical analysis from 10 μ M PGE₃-treated HEK/Mock and 10 μ M PGE₃-treated HEK/2A1.

第四節 考察

本章では、炎症時 PGE₂ および PGE₃ の組織分布における OATP2A1 の役割を検討することを目的に、まず OATP2A1 を含む PGE₂ 輸送体による PGE₃ の輸送を検討した。輸送体過剰発現 HEK293 細胞を用いた PGE₃ 取込み試験の結果、PGE₃ の取込みは OATP2A1 または OATP1B1 発現細胞で対照細胞 (HEK/Mock) と比べて有意に増加し、基質となることが示された。取込み時間 1 分における OATP2A1 発現細胞の PGE₃ 取込み活性は、OATP1B1 発現細胞と比べて 8 倍高かった (Figure 4)。また、PGE₃ は MRP4 の基質となることが示され (Figure 5)、PGE₃ の分泌に MRP4 が関与するという報告と一致する結果であった。

OATP2A1 は全身に広く発現しており (14)、特に PG 代謝が最も盛んな肺に高い発現を示す。OATP2A1 を発現する細胞として、肺においては肺細動脈、肺細静脈や II 型肺胞上皮 (33, 71)、大腸においては上皮 (72)、胃においては壁細胞や幽門腺 (73)、腎臓においては糸球体内皮、メサングウム細胞、集合管、髄質間質細胞、腎細動脈内皮や腎細静脈内皮 (71, 74)、肝臓においては肝細胞 (75) に発現がみられる。PGE₃ は OATP2A1 の基質となることから、PGE₂ および PGE₃ が細胞外へ分泌される場合は、細胞内コンパートメントへ OATP2A1 が取込むことで細胞質での不活性化を妨げ、組織中濃度の維持に働く、細胞内へ取込まれて代謝される場合は、OATP2A1 が細胞内へと取込み代謝による不活性化を促進することで組織中濃度の低下に働くという仮説を立て、炎症時における生体内の両化合物の全身組織分布における OATP2A1 の役割について検討した。PGE₃ の前駆体である EPA-E を経口投与して LPS により全身炎症を誘発させたマウスの肺、大腸、胃、腎臓、肝臓、脾臓の PGE₂ および PGE₃ 量を WT と *Slco2a1*^{-/-} マウス間で比較した。LPS および EPA-E 処置 WT マウスの各組織の中で、脾臓で PGE₂ および PGE₃ 量が最も高値を示した。WT と *Slco2a1*^{-/-} マウスの組織 PGE₂、PGE₃ 量を比較した結果、肺において *Slco2a1* 欠損により PGE₂ および PGE₃ 量の有意な上昇がみられた。また、大腸、胃、腎臓においては *Slco2a1* 欠損により PGE₂、PGE₃ 量の上昇傾向が、肝臓、脾臓においては低下傾向がみられた (Figure 8)。組織 PGE₂、PGE₃ 量の WT と *Slco2a1*^{-/-} マウスでみられた差は、これら前駆体の AA、EPA の組織量に比例していないか検討するため、PGE₂ 量を AA 量で、PGE₃ 量を EPA 量で除した値を算出した (Figure 9)。PGE₃/EPA の比は WT マウスと比較して *Slco2a1*^{-/-} マウスの肺において有意な上昇がみられ、PGE₂/AA の比においては *Slco2a1*^{-/-} マウスの脾臓において有意な低下がみられた。PGE₂ は EP に作用することで COX-2 の発現が誘導され、その結果として PGE₂ の合成が上昇することが報告されている (25)。このポジティブフィードバック機構が *Slco2a1*^{-/-} マウスの組織 PGE₂、PGE₃ 量に影響していないか、各組織における Cox-2 mRNA 量を WT と *Slco2a1*^{-/-} マウスで比較した。その結果、いずれの組織においても発現に有意な差がみられなかった。したがって、OATP2A1 の機能は肺と脾臓における PGE₂ および PGE₃ 分布に相反する様式で反映されることが示された。

続いて、PGE₂、PGE₃ の代謝酵素による不活性化に対する OATP2A1 の影響を評価した。

細胞質に発現する PGE₂ 代謝酵素 15-Pgdh は PG の代謝律速酵素で、加水分解により PG を不活性化させる(18)。OATP2A1 は細胞外から PGE₂ を取込むことで PGE₂ の不活性化を促進し、PGE₂ の生理作用を調節していることが考えられる。PGE₃ の代謝物に関しては、未だ同定されていないため、*Slco2a1* 欠損による PGE₃ の不活性化への影響を PGE₂ の代謝物 15-keto PGE₂ を測定することで代用した。PGE₂/15-keto PGE₂ の比は、WT マウスと比較して *Slco2a1*^{-/-} マウスの肺、大腸において有意な低下がみられた。大腸よりも肺で大きな差が観察されたことに関して、肺は PG 代謝が最も盛んな組織で、OATP2A1 の発現量も他の組織と比べて高いことから PGE₂ 代謝への寄与が大きいことが考えられる。以前の当研究室の検討において、肺の 15-Pgdh タンパク質発現量は WT と *Slco2a1*^{-/-} マウスで変化がないことから(39)、15-Pgdh の発現は *Slco2a1*^{-/-} マウスの肺 PGE₂ および PGE₃ 量に影響を与えないことが考えられる。したがって、肺においては *Slco2a1* 欠損により Oatp2a1 を介した細胞外 PGE₂ および PGE₃ 取込みが消失して不活性化が抑制されることで肺の PGE₂ および PGE₃ 量が上昇したことが示唆された。ただ本研究では、気管支肺胞洗浄を行わず肺組織をホモジネートしたため、組織および気管支・肺胞中 PG 量を分離して評価していない。当研究室の結果で、ブレオマイシンを器官内投与した *Slco2a1*^{-/-} マウスにおいて気管支肺胞洗浄液中の PGE₂ 濃度は WT マウスと比べて顕著に上昇したことから、Oatp2a1 は気管支肺胞洗浄液からの PGE₂ 取込みに寄与していること、さらに I 型肺胞上皮細胞の細胞形質膜に Oatp2a1 は強く発現しており、PGE₂ 取込みに関与していることを示した(39)。したがって、*Slco2a1*^{-/-} マウスの肺 PGE₂、PGE₃ 量が上昇した要因の一つとして I 型肺胞上皮細胞の Oatp2a1 を介した肺胞中 PGE₂ 取込みが消失したことが考えられる。以上の結果から、少なくとも OATP2A1 は肺および脾臓の PGE₂、PGE₃ 分布に関与することが示された。一方、WT と *Slco2a1*^{-/-} マウスで大腸、胃、腎臓、肝臓においては PGE₂ および PGE₃ 量に有意な差がみられなかった。PGE₃ を輸送する輸送体として OATP2A1 以外に OATP1B1 と MRP4 がある。肝臓には OATP1B1 が発現しており、また MRP4 は全身に広く発現していることから、これら輸送体を含む他の PGE₂ 輸送体が組織 PGE₂、PGE₃ 量を調節していることが考えられる。

PGE₃ に対する OATP2A1 の輸送特性を評価し、生体内において PGE₃ が OATP2A1 を介した PGE₂ 動態に与える影響を考察した。OATP2A1 における PGE₃ の K_m は 7.20 μ M、PGE₂ の K_m は 0.331 μ M であり、PGE₃ は PGE₂ に比べ 22 倍高く、OATP2A1 は PGE₂ に比べて PGE₃ に対して低親和性であることが示された。PGE₂ の ω 鎖に二重結合が一つ加わった PGE₃ は、立体構造における柔軟性が低下することで、OATP2A1 の親和性が低下したものと考えられる。これは、PGE₃ が PGE₂ と比べて EP や MRP4 への親和性が低いことと一致する(60, 76)。OATP2A1 を介した PGE₂ と PGE₃ の相互作用を検討するため、相互阻害試験を行った。PGE₂ は OATP2A1 を介した PGE₃ の取込みを 0.1 μ M で 55%、1 μ M で 89% 阻害した。一方、PGE₃ は OATP2A1 を介した PGE₂ 輸送を 0.1 μ M で 9%、1 μ M で 32% 阻害した。PGE₃ の IC_{50} は 0.590 μ M となり、これは PGE₂ の IC_{50} の 0.123 μ M に比べて 5 倍高い値であった。本研究では、各組織で PGE₃ が検出できるようにマウスに EPA-E を 1,000 mg/kg 経口投与した。しかし、臨

床における EPA-E の一日投与量 (1,800 から 2,700 mg) に比べ非常に高い投与量である(77, 78)。LPS および EPA-E を処置した WT マウスの肺 PGE₃ 濃度 (0.009 μM) と PGE₂ 濃度 (0.019 μM) は、PGE₂ 輸送に対する PGE₃ の IC₅₀ 値(0.590 μM)と PGE₃ 輸送に対する PGE₂ の IC₅₀ 値 (0.123 μM) より低い値であったことから、肺において PGE₃ と PGE₂ は OATP2A1 を介して相互作用しないと考えられる。一方、最も高い蓄積がみられた脾臓の PGE₃ 濃度(0.8 μM) および PGE₂ 濃度 (15.7 μM) は、PGE₃ と PGE₂ の IC₅₀ 値よりも高い値であったことから、OATP2A1 を介して相互作用することが示唆された。脾臓において *Slco2a1* 欠損により PGE₂、PGE₃ 量の低下がみられたことから、PGE₃ は OATP2A1 を介した PGE₂ 分泌輸送を低下させることで PGE₂ の代謝・分解を促進し、その結果 PGE₂ の作用を抑制すると考えられた。

OATP2A1 を介した PGE₃ の作用の検討するため、まず PGE₃ の増殖抑制作用を評価する目的で PGE₃ 処置によるヒト大腸がん由来 Lovo 細胞の増殖試験を行ったが、期待した増殖抑制効果がみられなかった。また、PGE₃ 処置による HEK/Mock 細胞の細胞増殖因子 VEGF の発現変動を評価した結果、期待した発現低下がみられなかったことから、PGE₃ は VEGF の発現量や Lovo 細胞の増殖に影響しないことが示唆された。しかし、Lovo 細胞に 1 μM PGE₂ を処置した条件においても PGE₂ の細胞増殖作用が確認されなかったことから細胞株を変更するなど条件を改善する余地がある。EPA 由来の抗炎症物質は PGE₃ 以外にもレゾルビンやプロテクチンなど多く存在しており、EPA の生理作用における PGE₃ の寄与は未だ明らかではない。今後、様々な病態モデル動物を用いて EPA の効果に対する OATP2A1 の寄与を明らかにしていく必要がある。

本研究から、PGE₃ は OATP2A1、OATP1B1 および MRP4 の基質となることが示され、炎症時 OATP2A1 は肺と脾臓において、組織 PGE₂、PGE₃ 分布に関与することが示された。OATP2A1 を介した PGE₃、PGE₂ 輸送に対する阻害効果から、脾臓において PGE₃ と PGE₂ は OATP2A1 上で相互作用し、PGE₃ が脾臓の OATP2A1 を阻害することで脾臓 PGE₂ 量が低下し PGE₂ 作用が抑制されることが示唆された。しかしながら、PGE₃ の細胞増殖抑制作用を確認できず、PGE₃ の作用における OATP2A1 の影響を評価できなかった。

LPS により炎症を誘発させた WT マウスの各組織のうち、PGE₂ 量は二次リンパ器官である脾臓で最も高い値を示した。脾臓は病原体に対する免疫応答の場といわれており、免疫細胞が産生され成熟する。PGE₂ は免疫細胞の増殖、分化および活性調節に関与し、免疫抑制作用を示す(31, 79-81)。脾臓において *Slco2a1* 欠損により PGE₂ 量の低下がみられたことから、OATP2A1 は脾臓の PGE₂ 量を調節し、生体内の免疫応答に重要な役割を担っていることが考えられる。そこで第二章では、OATP2A1 による脾臓内 PGE₂ 調節の意義について検討した。

第二章 脾臓における OATP2A1 の役割

第一節 諸言

第一章において、LPS および EPA-E 処置 WT マウスの各組織のうち、PGE₂ 量は脾臓で最も高い値を示した。二次リンパ組織である脾臓において、脾臓の動脈と静脈の間には脾洞という洞様血管があり、細長い棒状の杆状細胞から構成される。脾洞周辺には免疫細胞が存在し、血液中の生体異物に対して応答する。組織学的には赤脾髄と白脾髄からなる。赤脾髄では、Mφ が老化赤血球や感染赤血球を貪食し鉄のリサイクルに関与するとともに、細菌等を血液中から濾過除去しており、様々な生体異物に応答し炎症反応や免疫反応を惹起することで生体防御に関わる。白脾髄では、B 細胞および T 細胞が産生され成熟し、血液中に侵入した生体異物に対して免疫応答し、B 細胞は抗体を産生する。

第一章において、LPS および EPA-E 処置 WT マウスと比較して *Slco2a1*^{-/-} マウスの脾臓において PGE₂ 量が低下した要因として (Figure 8)、血中から脾臓内への PGE₂ 取込みが低下したこと、および PGE₂ の不活性化が促進したことが考えられる。血管内皮細胞に発現する OATP2A1 は PGE₂ の細胞内取込みに機能することから(82)、*Slco2a1* 欠損により血中から脾臓内への PGE₂ の供給が抑制されることで組織 PGE₂ 量が低下したことが考えられる。また、当研究室はマウス由来腹腔 Mφ およびマウス Mφ モデル RAW264 細胞に発現する *Oatp2a1* は炎症性刺激に応じた PGE₂ 分泌に関与することを示した(44)。脾臓内で PGE₂ 量が OATP2A1 により調節されていると仮定すると、Mφ などの細胞から PGE₂ の分泌が *Slco2a1* 欠損により抑制され、細胞質の代謝酵素による PGE₂ 代謝が促進した結果、組織 PGE₂ 量が低下した可能性がある。Mφ は脾臓で多く存在する血球であり(83)、炎症組織における PGE₂ の主要な供給源の一つである(45)。しかし、脾臓の血管を構成する細胞および脾臓 Mφ における OATP2A1 の発現は明らかでない。

PGE₂ の生理作用として、免疫細胞の増殖、分化および活性調節に関与することで免疫抑制作用を示す。PGE₂ は、マウス Mφ モデル RAW264.7 細胞やマウス腹腔 Mφ からの CCL5 産生を抑制することから、ヘルパー T 細胞や細胞傷害性 T 細胞の増殖を抑制して免疫抑制に関与することが示唆されている(79)。また、マウス脾臓制御性 T 細胞の転写因子である Foxp3 発現を誘導することで、制御性 T 細胞による抗 CD3 抗体で刺激した脾臓 T 細胞の増殖抑制作用を増強させる(80)。さらに、直接脾臓 T 細胞の EP2 に作用することで増殖抑制作用を示す(81)。PGE₂ 合成酵素である *mPges-1* 欠損マウスにおいては、血清中 IgM・IgG が低下し、T 細胞による液性免疫反応の低下がみられる(31)。さらに近年、ゲノムワイド関連解析において、PGE₂ 受容体の *EP4* 遺伝子がヒト自己免疫疾患の感受性遺伝子として同定された(84)。このように PGE₂ は免疫抑制に寄与することから、LPS および EPA-E 処置した *Slco2a1*^{-/-} マウスの脾臓における PGE₂ 量の低下は (Figure 8)、LPS による炎症反応の増悪を引き起こしているのではないかと考えられた。

脾臓は二次リンパ組織であるため、炎症により脾臓で免疫細胞が増殖・分化・活性化するとともに、免疫細胞が脾臓へ集まり免疫応答が行われ、免疫反応が活発になるに従い脾臓が肥大する。PGE₂合成酵素である*mPges-1*欠損マウスでは、WTマウスと比較して脾臓重量の増加が観察されることから(47)、PGE₂シグナルの低下は炎症反応に起因する脾臓の肥大化に関わることが考えられた。したがって、本研究で見出したOatp2a1の活性低下が引き起こす脾臓PGE₂量の低下は、炎症反応の増悪による脾臓の肥大化を引き起こすことが想定される。

第二章では、脾臓内 PGE₂ 分布・作用における OATP2A1 の役割を検討することを目的に、脾臓組織における Oatp2a1 の局在を免疫組織化学染色により検討した。また、*Slco2a1*^{-/-}マウスの脾臓において PGE₂ 量の低下に伴い炎症反応が増悪していることが考えられるため、WT と *Slco2a1*^{-/-}マウスの脾臓の肥大化を比較するとともに、*Slco2a1* 欠損による脾臓の組織学的な変化を評価した。さらに、炎症時の脾臓における PGE₂ の作用への OATP2A1 の影響として、正常時と炎症時の脾臓における Oatp2a1 の発現量を評価した。

第二節 実験方法

試薬および実験動物

Guinea pig anti-mouse Oatp2a1 IgG は富山大学大学院医学薬学研究部薬剤学研究室の細谷健一教授より提供いただいた。Lipopolysaccharide (LPS、*Escherichia coli* 0111:B4 由来) は Sigma-Aldrich から購入した。*Slco2a1*^{-/-} マウスおよび WT マウスは、当研究室で自家繁殖させたものを用いた。動物の取り扱いおよび飼育は、金沢大学動物実験指針 (Permit number、AP-132778、AP-143119、AP-153511) に従った。その他の試薬は市販される特級試薬を用いた。

免疫組織化学染色による脾臓 Oatp2a1 および F4/80 陽性細胞の局在

マウスにペントバルビタールを腹腔内に投与 (50 mg/kg body weight) し、麻酔した。マウスの尻尾をピンセットで摘み脊髄反射が無いことを確認した後、開胸し、心臓を露出させた。下大静脈に切り込みを入れ、右心から氷冷した PBS を 5 mL/min で 5 分間流した。その後 4% (w/v) パラホルムアルデヒド (PFA) /PBS に切り替えて、同様に 5 mL/min で 5 分間流し灌流固定を行った。その後、脾臓を傷付けないように、摘出し、4% (w/v) PFA/PBS に浸漬し、4°C で一晚固定した。

・パラフィン切片作製

4% PFA での固定後、PBS で脾臓を軽く洗い、70% (v/v) エタノール水溶液に漬けた。その後、自動固定包埋装置 RH-12DM (Sakura Finetek Japan Co.、Tokyo) を用いて、70、80、90、95、99.5% (v/v) エタノール水溶液、100% エタノール (2 回)、Tissue-Tek® Tissue-Clear® (Sakura Finetek Japan Co.、Tokyo) (3 回)、パラフィン (2 回) の順に、各溶液に 1 時間ずつ浸漬し、置換及び包埋を行った。包埋組織ブロックが完成後、ミクロトーム HM 360 (Microm International GmbH、Walldorf、Germany) を用いて厚さ 4 µm パラフィン切片標本を作製した。

・DAB 染色

免疫組織化学染色を行う際は、キシレン (4 回)、100% エタノール (3 回)、90、80、70% (v/v) エタノール水溶液、蒸留水にそれぞれ 4 分間浸漬し、脱パラフィン処理を行った。その後 20 mM Tris-HCl (pH 9.0) に切片を漬け、95°C で 15 分加熱することで抗原を賦活化し、その後室温まで自然冷却した。PBS で洗浄後、0.3% (v/v) H₂O₂/メタノールに 7 分間浸し内因性ペルオキシダーゼ活性を不活化した。パラフィン切片を 5% (w/v) スキムミルク /PBS に室温で 1 時間浸してブロッキングした。その後、一次抗体として guinea pig anti-Oatp2a1 IgG (1:150)、または rat anti-F4/80 IgG (1:100) を湿潤箱内で 4°C overnight で反応させた。各抗体の希釈には、2% (w/v) スキムミルクを用いた。

二次抗体として Oatp2a1 抗体に対しては biotin-conjugated anti-guinea pig IgG (1:200) を、F4/80 抗体に対しては biotin-conjugated anti-rat IgG (1:1000) を湿潤箱内で室温、1 時間反応させた。PBS で洗浄後、horseradish peroxidase (HRP)-conjugated streptavidin (LSAB2 kit; Dako、Glostrup、Denmark) を湿潤箱内で 1 時間反応させた。PBS で洗浄後、HRP 基質の 3, 3'-diaminobenzidine (DAB) を含む溶液 (ImmPACT™ DAB Substrate; Vector Laboratories、Burlingame、CA) を 1~2 分間反応させた。PBS で洗浄後、マイヤー・ヘマトキシリン溶液 (Wako Pure Chemical Industries、Osaka) に 40 秒間浸し、核染色を行った。流水で 5 分間洗い流した。70、80% (v/v) エタノール水溶液、90% (v/v) エタノール水溶液 (2 回)、100% エタノール (2 回)、キシレン (3 回) の順に、それぞれ 3 分間浸漬し、脱水・透徹処理を行った。封入剤 VectaMount® (Vector Laboratories、Burlingame、CA) を滴下し、カバーガラスで封入した。HS オールインワン顕微鏡 BZ-9000 (Keyence Corporation、Osaka) を用いて観察した。

Hematoxylin-eosin (HE) 染色

脾臓組織パラフィン切片 (4 µm) をキシレン (4 回)、100%エタノール (3 回)、90、80、70% (v/v) エタノール水溶液、蒸留水にそれぞれ 4 分漬けることで脱パラフィン処理を行った。マイヤー・ヘマトキシリン溶液 (Wako Pure Chemical Industries、Osaka) に 40 秒間浸し、核染色を行った。流水で 5 分間洗い流した。エオシン (Merck、Darmstadt、Germany) で細胞質を濃赤色に染色した。70、80% (v/v) エタノール水溶液、90% (v/v) エタノール水溶液 (2 回)、100%エタノール (2 回)、キシレン (3 回) の順に、それぞれ 3 分間浸し、脱水・透徹処理を行った。封入剤 VectaMount® (Vector Laboratories、Burlingame、CA) を滴下し、カバーガラスで封入した。HS オールインワン顕微鏡 BZ-9000 (Keyence Corporation、Osaka) を用いて観察した。

Picrosirius red 染色

Picrosirius red staining kit (Polysciences Inc.、Warrington、PA) を用い、製品のプロトコルにしたがって、脾臓組織パラフィン切片中のコラーゲンを鮮赤色に染色した。その後、70、80% (v/v) エタノール水溶液、90% (v/v) エタノール水溶液 (2 回)、100%エタノール (2 回)、キシレン (3 回) の順に、それぞれ 3 分間浸し、脱水・透徹処理を行った。封入剤 VectaMount® (Vector Laboratories、Burlingame、CA) を滴下し、カバーガラスで封入した。HS オールインワン顕微鏡 BZ-9000 (Keyence Corporation、Osaka) を用いて観察した。Picrosirius red により赤色に染色された面積は、画像解析ソフトウェア ImageJ(85)により計測し、白脾髄の面積に対する picrosirius red 反応陽性面積の割合でコラーゲンの蓄積を評価した。

炎症モデルマウスの作製

炎症を誘発させる目的で 7.5 mg/kg LPS をマウスに腹腔内投与し 6 時間後、各組織を採取した。

組織からの PGE₂ 抽出

各組織からの PGE₂ 抽出は、第一章 実験方法「組織からの PGE₃ 抽出」に従った。

LC-MS/MS による定量

LC-MS/MS による定量は、第一章 実験方法「LC-MS/MS による定量」に従った。

Western blotting

各組織は、第一章 実験方法「各組織の採取」に従った。 -80°C で保存した脾臓を解凍し、proteinase inhibitor cocktail (1:100, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を含む RIPA buffer を加え、さらにホモジナイズした。遠心 (10,000×g, 15 min, 4°C) し、懸濁液から未破碎細胞および核を除去した後、上清を採取し、粗膜画分とした。Bradford 法(86)によりタンパク定量を行い、30 µg を用いた。2-メルカプトエタノール (w/v, 5%) を含む 1×sample buffer を加え、99°C、5 分で還元した。SDS-PAGE により分離し、polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) に転写した。5% (w/v) スキムミルク/Tris- buffered saline and Tween 20 (TBS-T) を用いて室温で 1 時間ブロッキングした。タンパク質を転写した PVDF 膜を一次抗体と反応 (4°C、一晚) 後、二次抗体 HRP-conjugated anti-rabbit IgG (1:2000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) と反応させた (室温、2 時間)。PVDF 膜を 1×TBS-T で洗浄し、ImmunoStar® Zeta (#297-72403; Wako Pure Chemical Industries, Osaka) または ImmunoStar® LD (#296-69901; Wako Pure Chemical Industries, Osaka) による化学発光を Light-Capture II (ATTO Corporation, Tokyo) によって検出した。解析は CS analyzer (ver. 300.1008) を用い、デンストメトリ解析により、バンド強度を定量した。

RIPA Buffer

NaCl	150 mM
Tris	50 mM
NP-40 (v/v)	1.0 %
Sodium deoxycholate (w/v)	0.5 %
SDS (w/v)	0.1 %

adjusted to pH 8.0 with HCl

5 × Sample Buffer

Tris-HCl (pH 6.8)	312.5 mM
SDS (w/v)	10 %
Glycerol (v/v)	50 %
Bromophenol blue (BPB) (w/v)	0.05 %
2-Mercaptoethanol (w/v)	25 %

TBS-T

Tris	20 mM
NaCl	137 mM
Tween 20 (v/v)	0.1 %

adjusted to pH 7.5 with HCl

脾臓からの RNA 抽出および qRT-PCR

脾臓からの RNA 抽出および qRT-PCR は、第一章 実験方法「各組織からの RNA 抽出および qRT-PCR」に従った。検討に使用したプライマーを以下に示した。

Sequence of primers for RT-PCR

Target	Forward primer (5'to 3')	Reverse primer (5'to 3')
Oatp2a1	CTCCCGCTCGGTCTTCAAC	AGACCCCCCTATGCCGATCAT
Cox-1	TGAACATAACCGCGTGTGC	TTGAGCTGCAGGAAATAGCC
Cox-2	ATGAGTACCGCAAACGCTTC	TCTGGACGAGGTTTTTCCAC
Pges-1	GCACACTGCTGGTCATCAAG	ATGAGTACACGAAGCCGAGG
15-Pgdh	ACACACCCATCCTTGAATCC	TCGATGCCGTGATCTTCATA
Hprt	CGCAGTCCCAGCGTCGTGATT	CTTGAGCACACAGAGGGCCACCA

データ解析

統計学的解析は、Student's t-test を用いた。いずれも、 $p < 0.05$ の時に統計的に有意な差があると判断した。

第三節 実験結果

マウス脾臓における *Oatp2a1* の局在

脾臓における *Oatp2a1* の局在を検討するため、WT と *Slco2a1*^{-/-}マウスの脾臓組織パラフィン切片を用いて抗 *Oatp2a1* 抗体を用いた抗原抗体反応を行い、DAB 染色により検出した。WT マウスの脾臓において *Oatp2a1* の局在を示す茶褐色の呈色は、白矢印で示す赤脾髄で見られ (Figure 14、トップパネル)、赤脾髄の杆状細胞 (赤矢印) や一部の細胞 (黒矢印) で呈色がみられた (Figure 14、ボトムパネル)。一方で、*Slco2a1*^{-/-}マウスでは呈色がみられなかった。脾臓に存在する Mφ は、様々な生体異物に応答して PGE₂ 分泌に関与する。*Oatp2a1* の発現がみられた赤脾髄の一部の細胞は Mφ であることが考えられるため、次に、脾臓組織切片を赤脾髄 Mφ マーカーで染色した。

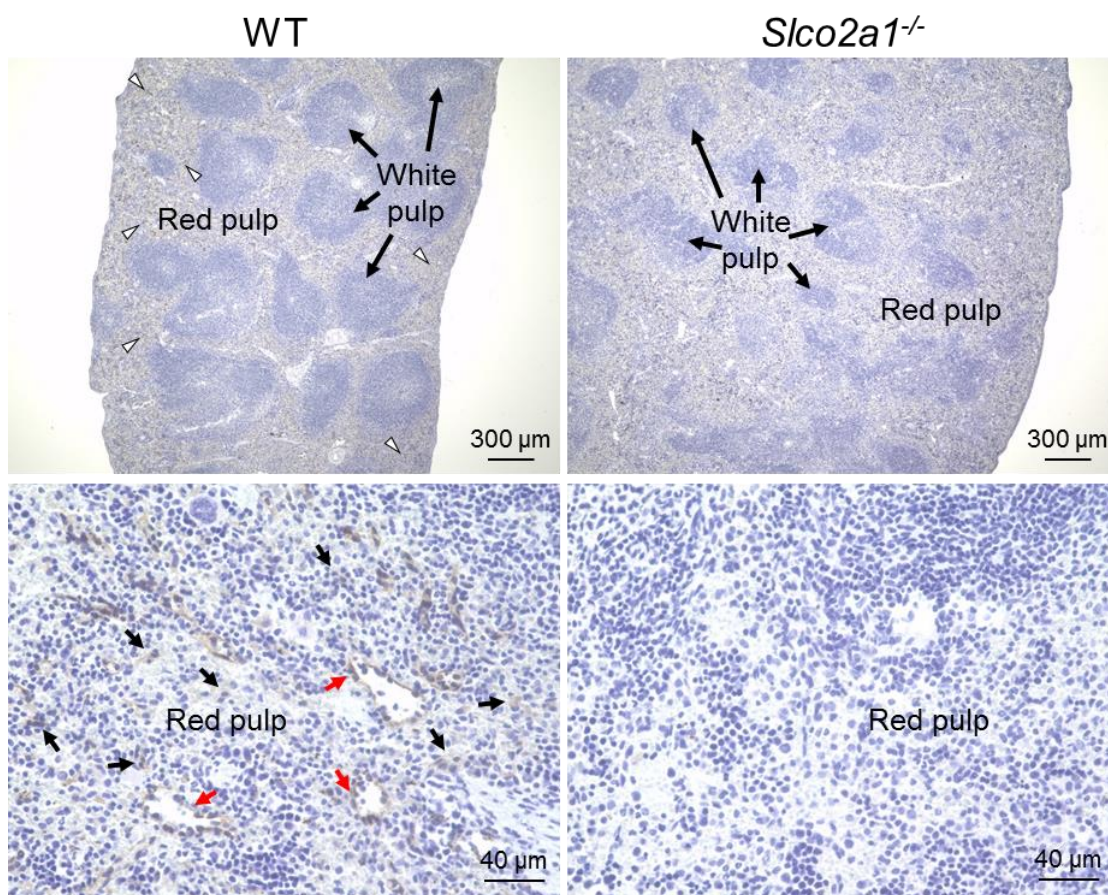


Figure 14 Immunohistochemical analysis of *Slco2a1* expression is shown in spleen of WT and *Slco2a1*^{-/-} mice.

Paraffin section (4 μm) of WT mouse spleen tissue was incubated with guinea pig anti-*Slco2a1* antibody and stained brown by immunoenzymatic reaction with DAB. Nuclei were stained by hematoxylin. Staining of spleen sections are presented at low (× 4, top panels) and high magnification (× 40, bottom panels).

マウス脾臓における F4/80 陽性細胞の局在

赤脾髄 Mφ マーカーとして F4/80 を選択し(46)、脾臓組織パラフィン切片を用いた DAB 染色により、F4/80 陽性細胞を検討した。また、一次抗体を省略した溶液で同様の操作を行い、ネガティブコントロールとした。F4/80 陽性細胞は主に赤脾髄の細胞で観察された (Figure 15、褐色部位)。したがって、赤脾髄において Oatp2a1 および F4/80 陽性細胞が共に認められた (Figure 14、15)。

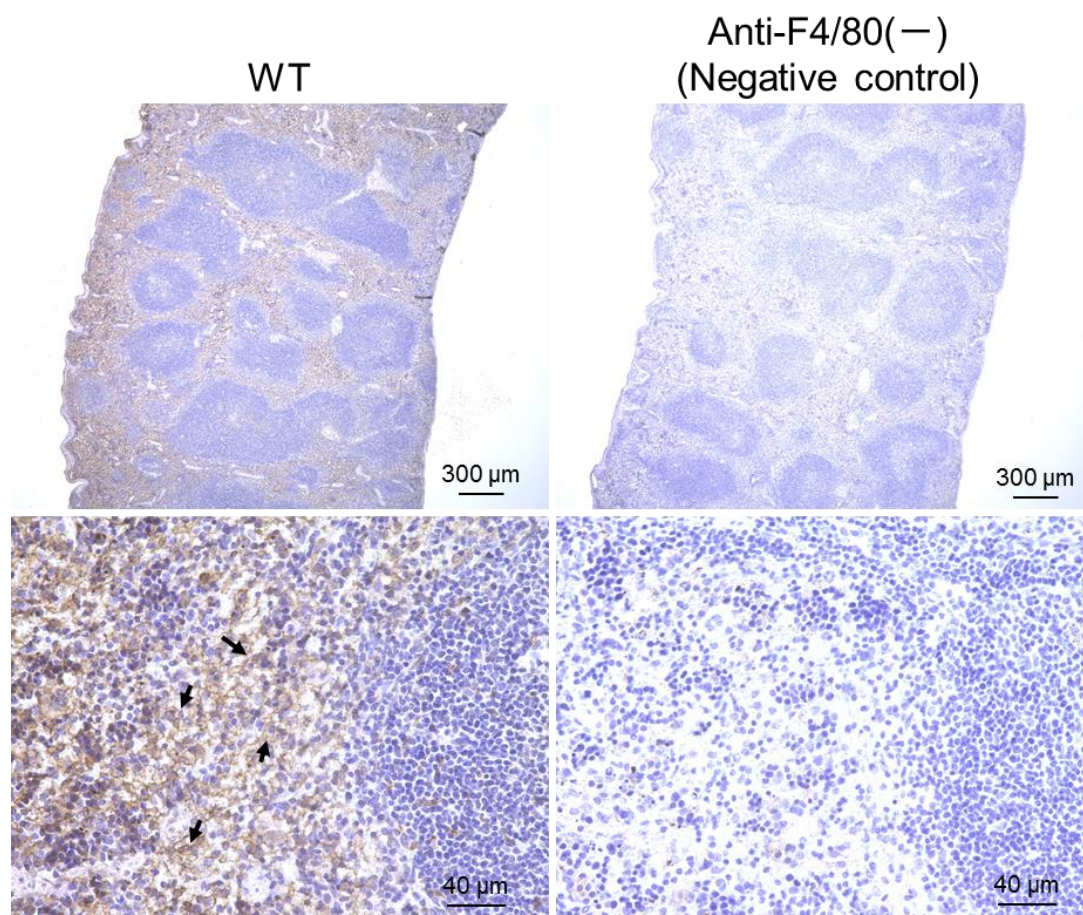


Figure 15 Immunohistochemical detection of F4/80 expression in spleen of WT and *Slco2a1*^{-/-} mice.

Paraffin section (4 μm) of WT mouse spleen tissue was incubated with anti-F4/80 antibody and stained brown by immunoenzymatic reaction with DAB. Nuclei were counter-stained blue with hematoxylin. Immunoreaction of F4/80 was detected in spleen tissue from WT mouse.

高週齢 *Slco2a1* 欠損マウスの脾臓の相対重量

加齢に伴い様々な組織に慢性的な炎症が惹起される。炎症反応が活発になるほど免疫細胞が脾臓に集積して脾臓が肥大することから、炎症反応の増悪による脾臓の肥大化と OATP2A1 の関係を検討した。40 週齢以上 (46-80 週齢) の *Slco2a1*^{-/-}マウスの脾臓において、脾臓の肥大化が観察された (Figure 16A)。また、40 週齢以上の WT と *Slco2a1*^{-/-}マウスにおいて、WT マウスの体重 1g 当たりの脾臓湿重量 (相対重量) と週齢の間に負の相関がみられた ($r = -0.457$, $p = 0.18$)。一方、*Slco2a1*^{-/-}マウスの相対重量と週齢の間には正の相関がみられ ($r = 0.754$, $p = 0.08$)、高週齢になるに従い相対重量は増加した (Figure 16B)。WT マウス (平均週齢 ; 62 ± 4 weeks) と *Slco2a1*^{-/-}マウス (平均週齢 ; 61 ± 5 weeks) の週齢に有意な差はなく、WT と *Slco2a1*^{-/-}マウスの脾臓の相対重量を比較した結果、*Slco2a1*^{-/-}マウスで有意な増加がみられた (Figure 16C)。

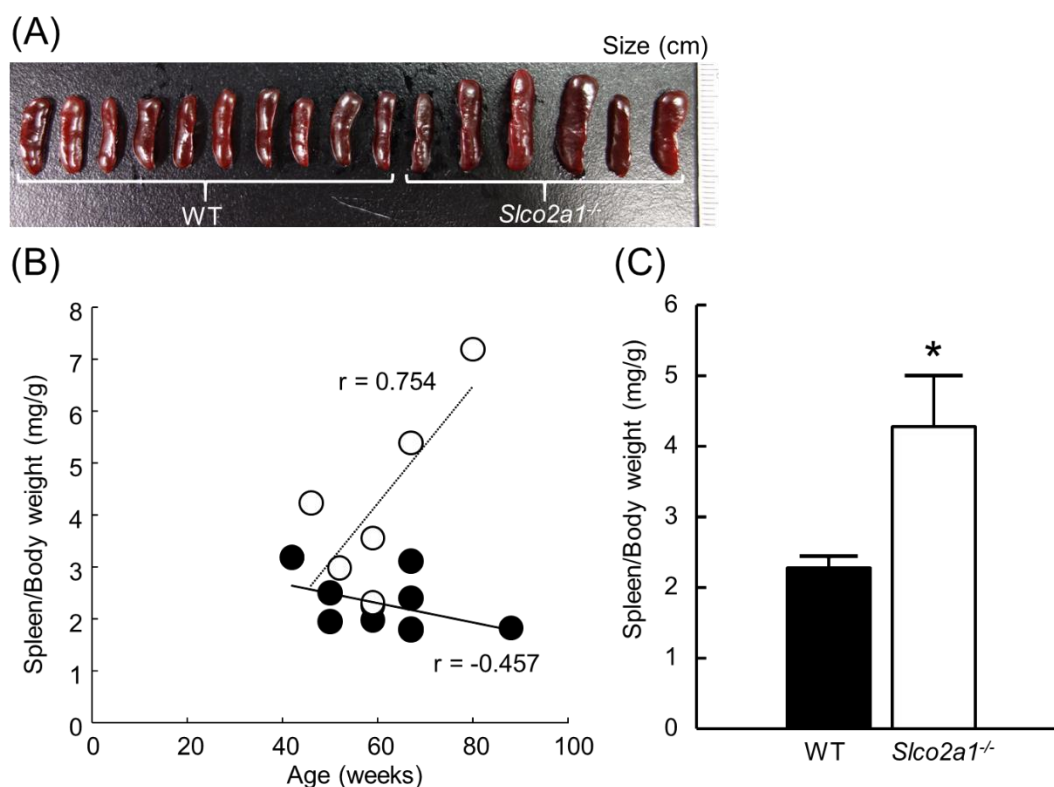


Figure 16 Spleen weights in WT mice aged 42-88 weeks or *Slco2a1*^{-/-} mice aged 46-80 weeks. Splens from WT mice aged 42-88 weeks ($n = 10$) and *Slco2a1*^{-/-} mice aged 46-80 weeks ($n = 6$) are shown in the photograph (A). Plots of spleen weight normalized body weight ratio versus age (42-88 weeks), with linear regression lines in WT (filled symbol, solid line) or *Slco2a1*^{-/-} (open symbol, dotted line) mice (B). Spleen weight normalized body weight ratio was compared between WT (closed column) and *Slco2a1*^{-/-} (open column) mice (C), and each bar represents the mean + S.E.M. (WT: $n = 10$, *Slco2a1*^{-/-}: $n = 6$). Student's t-test was used for statistical analysis (*, $p < 0.05$).

高週齢 *Slco2a1* 欠損マウスの脾臓組織構造

Slco2a1 欠損による脾臓組織構造の変化を検討するため、HE 染色により脾臓組織構造を評価した。その結果、WT マウスと比較して *Slco2a1*^{-/-}マウスの脾臓において、点線で示した白脾髄の構造が不明瞭であった (Figure 17)。 *Slco2a1*^{-/-}マウスの白脾髄において、核を染めるヘマトキシリンの青色陽性部位の減少、エオシンによる赤色陽性部位の増加が認められた。一方、赤脾髄においては、違いが観察されなかった。エオシンは細胞質を染めることから、*Slco2a1*^{-/-}マウスの白脾髄の細胞において細胞質が膨張していることが示唆された。

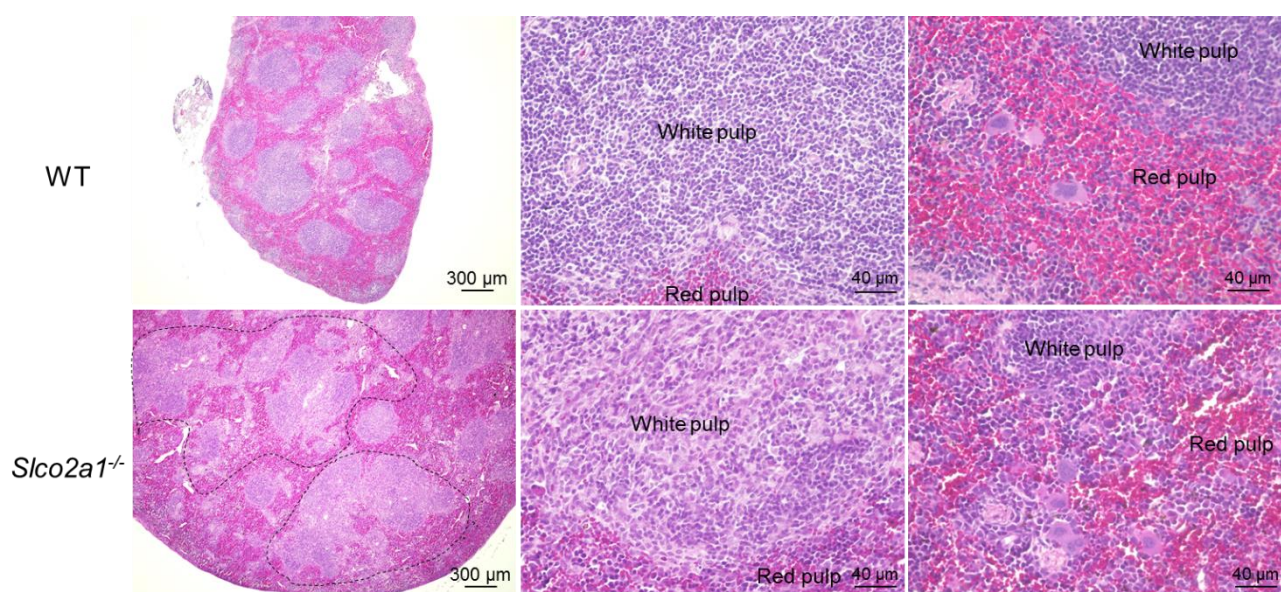


Figure 17 Hematoxylin and eosin stained sections of spleens from WT and *Slco2a1*^{-/-} mice.

Typical images of hematoxylin and eosin staining of spleen sections are shown at low (×4, left panels) and high magnification (×40, middle and right panels); bottom panel shows *Slco2a1*^{-/-} mouse aged 89 weeks and top panel shows WT mice aged 86 weeks.

高週齢 *Slco2a1* 欠損マウスの脾臓のコラーゲンの蓄積

脾臓の線維化と脾腫または脾臓 PGE₂ 量の関係は未だ明らかではない。コラーゲンを赤色に染める picosirius red 染色の結果、WT マウスと比較して *Slco2a1*^{-/-}マウスの白脾髄において、強い赤色の染色が観察された (Figure 18A)。コラーゲンの蓄積を定量的に評価するため、画像解析ソフトウェア Image J(85)を用いて白脾髄面積に占める picosirius red 陽性面積の割合を計測した。その結果、その割合は WT マウスと比べ *Slco2a1*^{-/-}マウスで有意に高かった (Figure 18B)。以上の結果から、*Slco2a1* 欠損により脾臓が線維化することが示された。

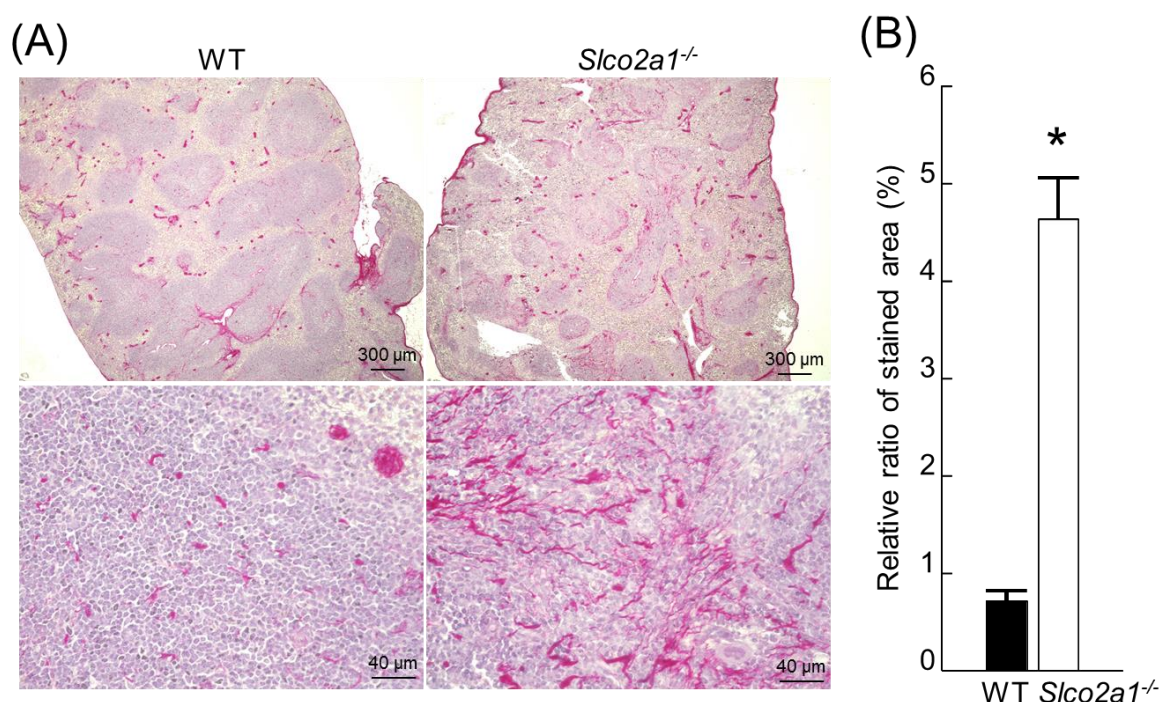


Figure 18 Immunohistochemical analysis of paraffin-embed spleen sections from WT and *Slco2a1*^{-/-} mice.

A typical image of picosirius red staining of spleen section is presented at low (×4, top panels) and high magnification (×40, bottom panels) (A). Relative ratio (%) of the stained area significantly increased in *Slco2a1*^{-/-} (open column), compared to that in the WT (closed column) mice (B). Each bar represents the mean value of randomly selected 13 picosirius red-stained images from 1 mouse. Student's t-test was used for statistical analysis (*, $p < 0.05$).

高週齢 *Slco2a1* 欠損マウスの各組織 PGE₂ の定量

高週齢マウスにおいて、*Slco2a1* 欠損による各組織の PGE₂ 量への影響を評価するため、脾臓、肺、大腸、胃、腎臓、肝臓の PGE₂ 量を LC-MS/MS により定量した。WT マウスと比較して *Slco2a1*^{-/-} マウスの脾臓において、PGE₂ 量の有意な低下がみられた (Figure 19)。一方、肺、大腸において、*Slco2a1*^{-/-} マウスで有意な上昇がみられた。胃においては、WT マウスと *Slco2a1*^{-/-} マウスで有意な差がみられず、腎臓、肝臓の PGE₂ 量は検出限界以下であった。

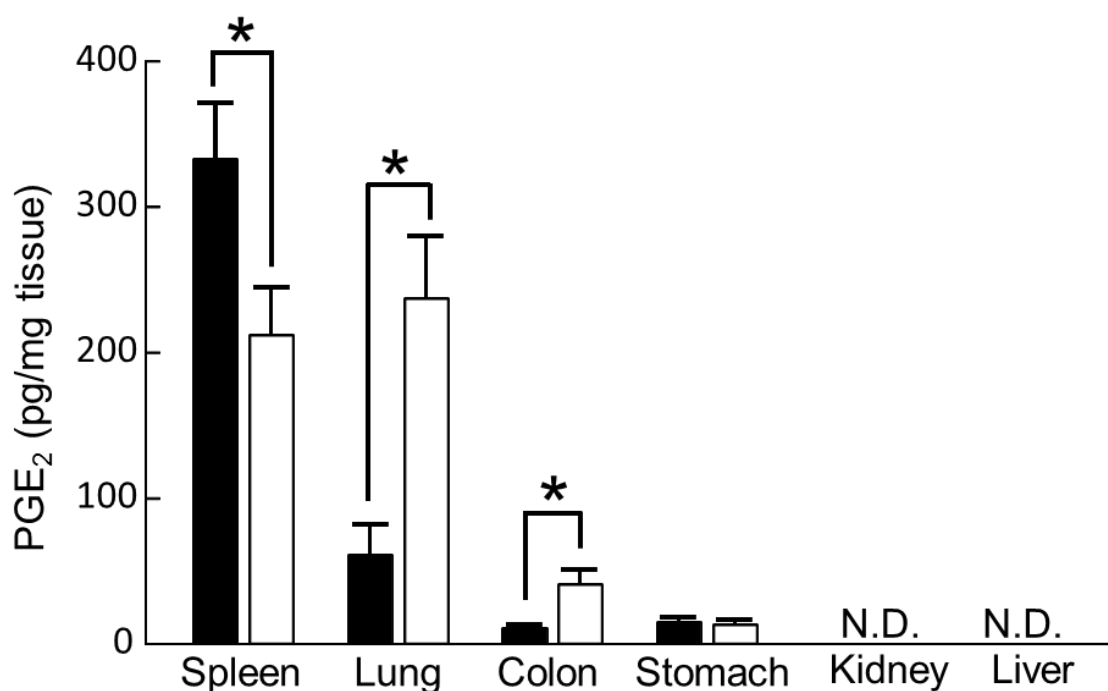


Figure 19 Tissue disposition of PGE₂ in *Slco2a1*^{-/-} mice.

Amount of PGE₂ in spleen, lung, colon, stomach, kidney, and liver was determined by LC-MS/MS in WT (closed column) and *Slco2a1*^{-/-} (open column) mice. PGE₂ amount was normalized by wet weight of tissue. Each bar represents the mean + S.E.M. (WT: n = 10, *Slco2a1*^{-/-}: n = 6). *, significantly different from WT mice by Student's t-test ($p < 0.05$).

高週齢 *Slco2a1* 欠損マウスの脾臓 Cox-2 および 15-Pgdh タンパク質発現

高週齢マウスの *Slco2a1*^{-/-}マウスで脾臓 PGE₂ 量が低下したことから、PGE₂ の合成酵素の発現低下や代謝酵素の発現上昇が考えられた。そこで、炎症時に誘導される合成酵素の Cox-2 および代謝の律速酵素である 15-Pgdh のタンパク質発現量を検討した (Figure 20)。 *Slco2a1*^{-/-}マウスの脾臓において、15-Pgdh の発現は有意な低下が観察された一方、Cox-2 の発現に有意な差がみられなかった。

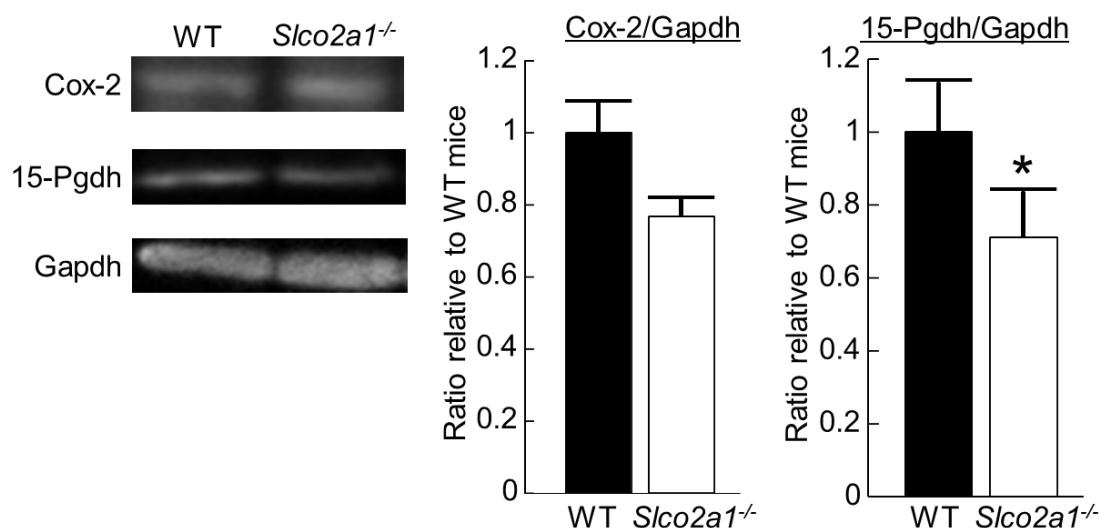


Figure 20 Western blot analyses of PGE₂-related proteins in spleen.

Expression of proteins related to PGE₂ was studied by Western blot analysis using spleen homogenates prepared from WT and *Slco2a1*^{-/-} mice (four per each group), and representative images are shown. Quantitative analysis of each protein was performed. Degree of expression of Cox2 and 15-Pgdh are shown by normalizing band intensity with that corresponding to Gapdh. Expression was compared between WT (closed column) and *Slco2a1*^{-/-} (open column) mice, and each column represents the mean + S.E.M. (spleen tissues from 4 individual mice). Student's t-test was used for statistical analysis (*, $p < 0.05$).

LPS 誘発性急性炎症モデルマウスの脾臓 Oatp2a1 および PGE₂ 関連酵素の発現変動

炎症時の脾臓 PGE₂ 量の調節における OATP2A1 の役割として、炎症刺激による脾臓 Oatp2a1 の発現変動を評価した。脾臓から RNA を抽出し、Oatp2a1 mRNA 発現を qRT-PCR で測定した。Figure 21 に示すように、LPS を腹腔内投与したマウス由来脾臓において、Oatp2a1 の mRNA 発現が 6.5 倍有意に低下した。また、合成酵素 Cox-2 および Pges-1 の mRNA 発現は有意に上昇し、代謝酵素 15-Pgdh の mRNA 発現は有意に低下した。

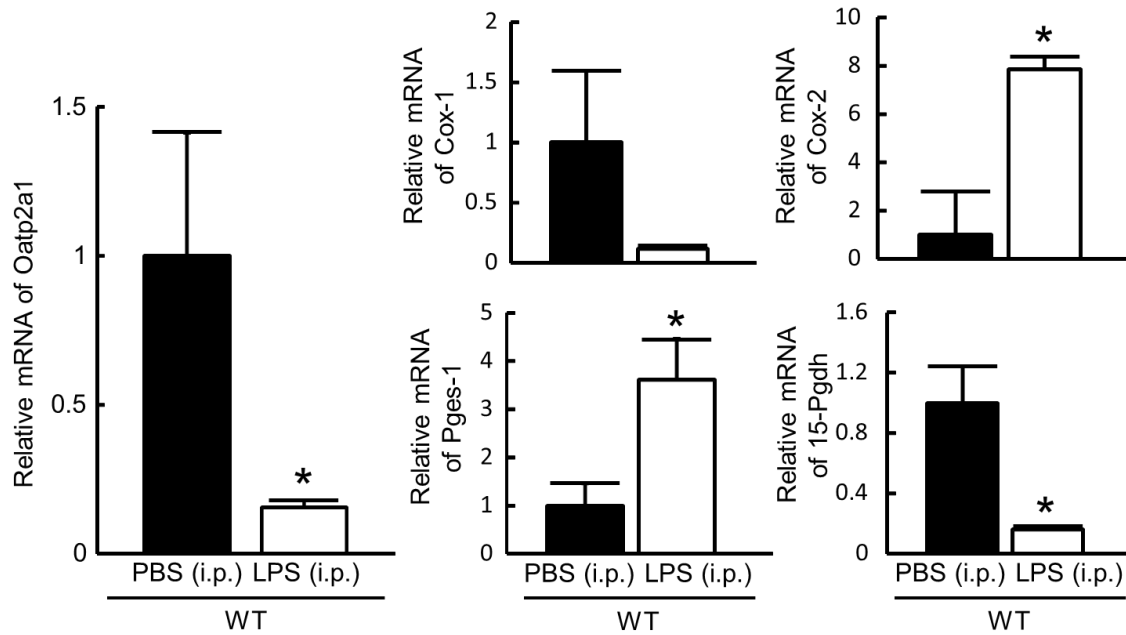


Figure 21 mRNA expression of Oatp2a1 and PGE₂-related enzymes in spleen.

mRNA levels of Oatp2a1 and PGE₂-related enzymes were measured by qRT-PCR. Each bar of WT (closed column) or *Slco2a1*^{-/-} (open column) mice represents the mean + S.E.M. (n = 4-5). *, significantly different from WT (PBS i.p.) mice by Student's t-test ($p < 0.05$).

LPS 誘発性急性炎症モデル *Slco2a1* 欠損マウスの脾臓の相対重量

炎症時、脾臓 *Oatp2a1* の発現変動がみられたことから、脾臓 OATP2A1 は炎症反応の調節に関わっていることが示唆された。そこで、次に急性炎症反応と OATP2A1 の関係を、LPS 投与により急性炎症を誘発させた WT と *Slco2a1*^{-/-}マウスの脾臓の相対重量を比較することで評価した。まず、PBS 投与 WT マウスと LPS 処置 WT マウスの相対重量を比較した結果、PBS 投与 WT マウスと比べて LPS 処置 WT マウスで相対重量の有意な増加がみられた

(Figure 22)。そこで、LPS 処置 WT と LPS 処置 *Slco2a1*^{-/-}マウスの相対重量を比較した結果、WT と *Slco2a1*^{-/-}マウスで相対重量に変化はみられなかった。したがって、急性炎症において OATP2A1 は脾臓の PGE₂ 量を変動させるが、脾臓の肥大化には影響を与えないことが示された。

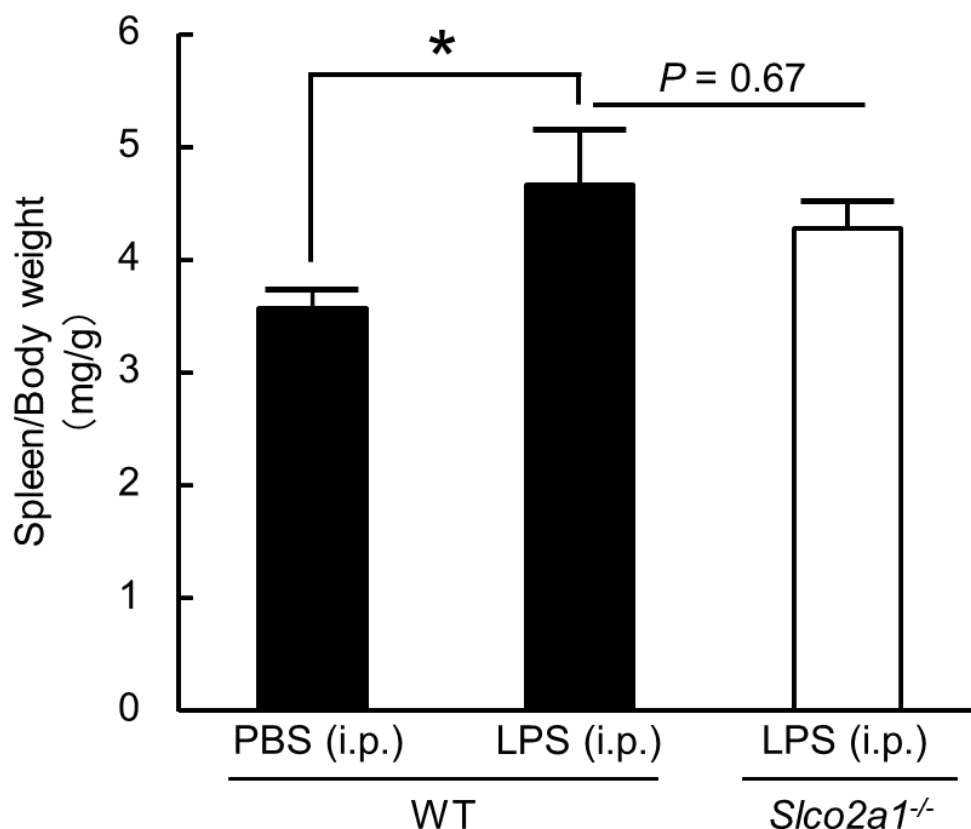


Figure 22 Spleen weights in LPS-treated or -untreated WT (closed column) mice or LPS-treated *Slco2a1*^{-/-} mice.

Each bar of WT (closed column) or *Slco2a1*^{-/-} (open column) mice represents the mean + S.E.M. (n = 4-5). Student's t-test was used for statistical analysis (*, $p < 0.05$).

第四節 考察

本章では、OATP2A1による脾臓内PGE₂調節の意義について検討することを目的に、まず、脾臓におけるOatp2a1の局在を評価した。脾臓においてOatp2a1は杆状細胞や赤脾髄の一部の細胞で発現がみられた (Figure 14)。赤脾髄に存在する細胞として、Mφは様々な生体異物に応答し、PGE₂分泌に関与する。マウス腹腔MφにOatp2a1が発現することからも、脾臓MφにおいてOatp2a1が発現していると考えられた。そこで、赤脾髄MφマーカーとしてF4/80を選択し、DAB染色によりF4/80陽性細胞の発現部位を検討した。F4/80陽性DAB染色は主に赤脾髄の細胞で観察されたことから (Figure 15)、赤脾髄においてOatp2a1およびF4/80陽性細胞が共に認められた。したがって、Oatp2a1は杆状細胞およびMφに発現することが示唆された。

脾臓内PGE₂分布におけるOATP2A1の役割として、LPSおよびEPA-E処置炎症モデルマウス (Figure 8) および高週齢マウス (Figure 21) の脾臓において、*Slco2a1*欠損によりPGE₂量の低下がみられた。脾臓において合成酵素Cox-2のタンパク質発現に変化がなく、代謝の律速酵素15-Pgdhの発現は*Slco2a1*欠損により有意に低下したことから (Figure 22)、*Slco2a1*欠損によるPGE₂量の低下は、PGE₂の合成酵素の発現低下や代謝酵素の発現上昇では説明できないことが示された。したがって、OATP2A1はCOX-2および15-PGDHとは独立して細胞内外のPGE₂分布を変動させることが示唆された。血管内皮細胞に発現するOATP2A1はPGE₂の細胞内取込みに機能することから(82)、類洞を構成する杆状細胞に発現するOATP2A1はPGE₂の細胞内取込みに機能することが考えられ、杆状細胞間の隙間は赤血球が通過できるほど十分に広いことから、OATP2A1は血中から組織内へのPGE₂の膜透過ではなく、杆状細胞内へのPGE₂の蓄積に働くことが考えられる。また、マウス腹腔MφおよびマウスMφモデルRAW264細胞に発現するOatp2a1はPGE₂分泌に関与することから(44)、脾臓Mφに発現するOATP2A1はPGE₂分泌に関与することが考えられる。*Slco2a1*欠損によりPGE₂量が低下した要因として、杆状細胞に発現するOatp2a1を介した血中から杆状細胞内へのPGE₂取込みが消失したこと、および脾臓Mφに発現するOatp2a1を介したPGE₂分泌の消失により細胞質の代謝酵素によるPGE₂の不活性化が促進したことから、結果として組織PGE₂量が低下したことが考えられる。脾臓PGE₂量は5,540 pg/mgであった (Figure 8) のに対して血中のPGE₂は検出限界 (2 pg/μL) 以下であったことから、血中濃度に比べて脾臓中濃度は2,770倍以上であることが示唆された。つまり、脾臓のPGE₂は主に脾臓内で産生されたものであると考えられた。したがって、*Slco2a1*欠損によるPGE₂量の低下において、血中から杆状細胞内へのPGE₂取込みよりも、脾臓MφのOATP2A1を介したPGE₂分泌の寄与が大きいことが示唆された。

脾臓は二次リンパ組織であるため、炎症により脾臓で免疫細胞が増殖・分化・活性化するとともに、免疫細胞が脾臓へ集まり免疫応答が行われる。免疫反応が活発になるに従い脾臓が肥大する。炎症時、PGE₂は免疫抑制作用を示し、免疫細胞の脾臓への集積を抑制さ

せることから(87)、本研究で見出した OATP2A1 の活性低下が引き起こす脾臓 PGE₂ 量の低下は、炎症反応の増悪による脾臓の肥大化を引き起こすことが想定された。そこで、脾臓の PGE₂ 作用における OATP2A1 の役割として、脾臓の肥大化と OATP2A1 との関係を検討した。PBS 投与 WT マウスと比べて LPS 処置 WT マウスで脾臓の相対重量の増加 (Figure 22)、ならびに LPS 処置 WT マウスの脾臓で *Oatp2a1* mRNA 発現量の低下 (Figure 21) がみられた。したがって、炎症により脾臓が肥大することが確認でき、脾臓 OATP2A1 の発現低下が脾臓の肥大化に関与することが示唆された。

加齢は生活習慣病、自己免疫疾患、神経変性疾患といった慢性炎症性疾患の発症・進展の原因の一つであり、加齢に伴って様々な組織に慢性的な炎症が惹起される。これら慢性的な炎症に PGE₂ の関与が示唆されていることから(3)、脾臓の肥大化と OATP2A1 の関係を 42-88 週齢の高週齢 WT と *Slco2a1*^{-/-}マウスを用いて検討した (Figure 16)。その結果、*Slco2a1*^{-/-}マウスにおいて脾臓の相対重量と週齢の間に正の相関が認められた ($r = 0.754$) 一方、WT マウスは負の相関が認められた ($r = -0.457$) (Figure 16B)。WT と *Slco2a1*^{-/-}マウスの脾臓の相対重量を比較した結果、*Slco2a1*^{-/-}マウスで有意な増加がみられた (Figure 16C)。したがって、*Slco2a1* 欠損により加齢に伴う慢性的な炎症が誘発することが示唆された。PGE₂ 合成酵素である *mPges-1* 欠損マウスでは、WT マウスと比較して脾臓重量の増加が観察されることから、PGE₂ シグナルの低下は炎症の増悪による脾臓の肥大化に関わることが考えられる(47)。したがって、高週齢 *Slco2a1*^{-/-}マウスの脾臓 PGE₂ 量の低下により PGE₂ の免疫細胞に対する免疫抑制作用が低下し、加齢に伴い慢性炎症が増悪したことが示唆された。急性炎症反応における OATP2A1 の関与を検討するため、マウスに LPS を腹腔内投与することで急性炎症を誘発させた WT と *Slco2a1*^{-/-}マウスの脾臓の相対重量を比較した。その結果、LPS 処置 WT と *Slco2a1*^{-/-}マウスの相対重量に差がみられなかった (Figure 22)。したがって、急性炎症において OATP2A1 は脾臓 PGE₂ 量を変動させるが、脾臓の肥大化には影響を与えないことが示された。

続いて、高週齢 *Slco2a1*^{-/-}マウスの脾臓の組織学的な変化を評価した。HE 染色の結果、WT マウスと比較して *Slco2a1*^{-/-}マウスの脾臓において白脾髄の構造が不明瞭であり、*Slco2a1*^{-/-}マウスの白脾髄においてヘマトキシリンの青色陽性部位の減少がみられた (Figure 17)。さらに picrosirius red 染色の結果、*Slco2a1*^{-/-}マウスの白脾髄においてコラーゲンの蓄積の上昇が認められ (Figure 18)、*Slco2a1*^{-/-}マウスの白脾髄が線維化し、貯留細胞数が低下していることが示唆された。白脾髄では免疫細胞が成熟し免疫応答が行われることから、*Slco2a1* 欠損により免疫応答に異常が生じる可能性が考えられた。脾臓の線維化は *Cox-2* 欠損マウスの脾臓においてもみられる(88)。*Cox-2* 遺伝子欠損により骨髓での巨核球の産生が低下するとともに脾臓で巨核球の過形成がみられることから、脾臓の線維化メカニズムの一つとして、巨核球由来サイトカインが脾臓の線維化に作用しているのではないかと考察されている。脾臓 PGE₂ 量が直接脾臓の線維化に関与するのか不明であるが、*SLCO2A1* 遺伝子変異と骨髓線維症との関連が報告されていることから(89)、OATP2A1 は骨髓の PGE₂ 量を

調節して巨核球の産生に関与することが考えられる。今後、*Slco2a1*^{-/-}マウスの脾臓の線維化メカニズムに関して、骨髄における OATP2A1 の役割との関連について詳細に検討する必要がある。

本研究から、LPS および EPA-E 処置および高週齢 *Slco2a1*^{-/-}マウスの脾臓 PGE₂ 量が WT マウスと比較して低下した要因として、脾臓 Mφ に発現する OATP2A1 を介した PGE₂ 分泌の消失により細胞質の代謝酵素による PGE₂ の不活性化が促進したことが示唆された。また、高週齢 *Slco2a1*^{-/-}マウスの脾臓の相対重量は WT マウスと比較して有意な増加がみられたことから、*Slco2a1* 欠損により脾臓 PGE₂ 量が低下し、PGE₂ の免疫細胞に対する免疫抑制作用が低下することで、加齢に伴い慢性炎症が増悪したことが示唆された。興味深いことに、高週齢 *Slco2a1*^{-/-}マウスの白脾髄において線維化がみられた。したがって、生体内において脾臓 Mφ の OATP2A1 を介した PGE₂ 分泌は免疫・炎症反応の調節に関与することが示唆された。今後、脾臓の局所 PGE₂ 動態と炎症反応に対する OATP2A1 の役割をより詳細に検討していく必要がある。

現在のところ、PGE₂ 分泌が抑制されると細胞内での PGE₂ の不活性化が促進するという報告はない。そこで第三章では、*Slco2a1* 欠損による脾臓 PGE₂ 量の低下は、Mφ の Oatp2a1 を介した PGE₂ 分泌が消失することで PGE₂ の代謝・分解による不活性化が促進したことによるという仮説を検証することを目的に、*Slco2a1*^{-/-}マウス由来腹腔 Mφ および OATP2A1 阻害剤 (TGBz) 処置マウス Mφ モデル RAW264 細胞を用いて、Mφ の PGE₂ 分泌における OATP2A1 の役割を PGE₂ とその代謝物を測定することで評価した。

第三章 PGE₂ 分泌における細胞内 OATP2A1 の役割

第一節 諸言

第二章において、高週齢 *Slco2a1*^{-/-}マウスの脾臓 PGE₂ 量は WT マウスと比較して有意な低下がみられ、この *Slco2a1* 欠損による脾臓 PGE₂ 量の低下は、Mφ の Oatp2a1 を介した PGE₂ 分泌が消失することで PGE₂ の不活性化が促進したことによると仮説を立てた。PGE₂ は細胞内で 15-PGDH により 15-keto PGE₂ へ酸化され、さらに 13-PGR によって 13, 14-dihydro-15-keto PGE₂ へ代謝される。13, 14-dihydro-15-keto PGE₂ は非酵素的に 13, 14-dihydro-15-keto PGA₂ に分解される (Figure 23) (90)。

オートコイドである PGE₂ は細胞外の EP に作用した後、速やかに局所で消失する。Nomura らは、OATP2A1 による PGE₂ 取込みが PGE₂ 代謝の律速段階であることを示唆している(18)。このような OATP2A1 の役割は、OATP2A1 を細胞形質膜に発現するヒトやげっ歯類の血管内皮細胞や上皮細胞において遺伝子改変や阻害剤を用いた検討により支持されている(39, 71, 72, 82, 91, 92)。

PG 類は、炎症刺激により cPLA2 が細胞質から脂質二重膜へ移行した後、AA が脂質二重膜から切り出され、核周縁膜で COX/PGES 経路によって合成される(93)。特に PGE₂ の分泌経路においては、単純拡散(94) や細胞形質膜の輸送体を介した経路(13, 95) が報告されている。OATP2A1 による PGE₂ 輸送に乳酸など一価の有機酸との交換輸送が示唆されており、内向きの有機酸の勾配が存在するような条件下では、*trans-stimulation* 効果（基質輸送促進効果）により細胞内の PGE₂ が外向きに輸送されることが報告されている(94)。一方、当研究室では、乳酸などの内向きの勾配がなくても PGE₂ の濃度勾配より PGE₂ が細胞内から外へ輸送されることをアフリカツメガエル卵母細胞で確認した(61)。したがって、細胞形質膜に発現していても、OATP2A1 は周囲の微小環境に依存して PGE₂ の分泌に働くことが示唆されているが、その生理的意義は *in vivo* では確認されておらず、現在も不明である。近年、新たな PGE₂ の分泌経路としてエクソソームを介した膜動輸送による経路が報告された(96)。しかし、エクソソームに内包された PGE₂ の分泌は、PGE₂ が放出された環境下で PGE₂ の受容体への結合を保証するものではなく、PGE₂ 生理作用への寄与に対する議論の余地が残されている。

2015 年、当研究室の Shimada らは、Oatp2a1 がマウス由来腹腔 Mφ およびマウス Mφ モデル RAW264 細胞において細胞内酸性コンパートメントに発現することに着目し、OATP2A1 により酸性コンパートメントに貯留された PGE₂ が Ca²⁺流入刺激により、開口分泌されることを提唱した(44)。本仮説は、*Slco2a1*^{-/-}マウス由来腹腔 Mφ からの PGE₂ 分泌が約 50%程度に減少するという事実により支持された。したがって、Mφ 内で合成された PGE₂ は、酸性コンパートメントに一時的に格納されるため、細胞内 15-PGDH により代謝を受けず、刺激に応答した効率のよい PGE₂ 分泌が可能になることを示唆している(44)。神経細胞ではセロ

トニンやドーパミンなどの神経伝達物質ではよく知られた事実であるが(97)、PGE₂のようなオートコイドではこのような細胞内動態調節は今まで報告されていなかった。

このような背景から、OATP2A1 発現が PGE₂ の分泌に関与することが考えられた。しかし、細胞内での PGE₂ の不活性化を回避させる作用についてはそれを支持する具体的な根拠はない。前章において、Mφ が他の組織に比べて多く存在する脾臓の PGE₂ 量が *Slco2a1* 欠損により有意に低下したことを受けて、本章では Mφ 内での PGE₂ 代謝物を含めた PGE₂ 細胞内動態を *Slco2a1* 機能・発現抑制下で定量的に解析することにより、OATP2A1 が脾臓内での PGE₂ 動態に果たす役割を明らかにすることを目的に研究を推進した。PGE₂ を検出できるだけの十分な数の赤脾髄 Mφ を一匹のマウスから採取できないことから、赤脾髄 Mφ と同じく F4/80 陽性のマウス腹腔 Mφ および RAW264 細胞を用いて検討を行った。

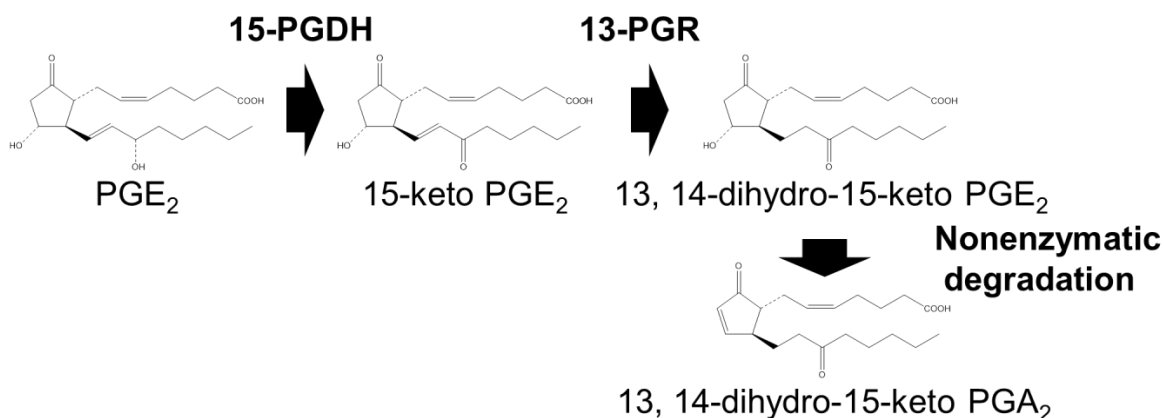


Figure 23 Catabolism of PGE₂

PGE₂ oxidized by 15-PGDH (15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase) and 13-PGR (15-ketoprostaglandin $\Delta^{13,14}$ -reductase) expressed in the cytoplasm to 13, 14-dihydro-15-keto PGE₂, followed by further non-enzymatical oxidation into 13, 14-dihydro-15-keto PGA₂.

第二節 実験方法

試薬および実験動物

TGBz T34 (TGBz) は小野薬品工業株式会社 (Osaka) より提供いただいた。PGE₂、15-keto PGE₂、13, 14-dihydro-15-keto PGE₂、13, 14-dihydro-15-keto PGA₂、d4-PGE₂、および d4-13, 14-dihydro-15-keto PGE₂ は Cayman Chemical (Ann Arbor, MI) より購入した。その他の試薬は市販される特級試薬を用いた。*Slco2a1*^{-/-} マウスおよび WT マウスは、当研究室で自家繁殖させたものを用いた。動物の取り扱いおよび飼育は、金沢大学動物実験指針 (Permit number, AP-132778, AP-143119, AP-153511) に従った。

細胞培養

マウス Mφ モデル RAW264 細胞は RIKEN BioResource Center (Ibaraki) から提供いただいた。RAW264 細胞は 10% (v/v) FBS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)、100 U/mL ベンジルペニシリン (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) および 100 μg/mL ストレプトマイシン (Wako Pure Chemical Industries, Osaka) を含む D-MEM (Wako Pure Chemical Industries, Osaka) を用いて、5% CO₂ インキュベーター内 (37°C) で培養した。

腹腔 Mφ の単離

4% (w/v) Brewer Modified Thioglycollate Medium (Becton Dickinson and Co., Franklin Lakes, NJ) 2 mL をマウスの腹腔内に投与し、4 日後にペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg body weight) 腹腔内投与によりマウスを麻酔した後、氷冷した 5 mL PBS で腹腔内を洗浄し、腹腔内細胞を採取した。腹腔細胞を遠心 (1,000 rpm、10 min) により沈殿させ、再度 2 mL PBS に懸濁し遠心操作 (1,000 rpm、10 min) により回収した。沈殿した細胞を 10% (v/v) FBS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)、100 U/mL ベンジルペニシリン (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) および 100 μg/mL ストレプトマイシン (Wako Pure Chemical Industries, Osaka) を含む D-MEM (Wako Pure Chemical Industries, Osaka) に懸濁し、播種した。2 時間 5% CO₂ インキュベーター内 (37°C) で培養後、非接着細胞を PBS で 3 回洗浄することにより除去し、接着細胞を腹腔 Mφ として実験に用いた。

腹腔 Mφ からの PGE₂ 産生試験

Yamazaki らの方法を参考にした(98)。腹腔 Mφ に 1 μg/ml LPS を 4 時間曝露し、COX および PGES を誘導させた。細胞に 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0) を 1 ml 加え、細胞を回収し、超音波処理により破碎した。15,000 rpm で 10 分間遠心し、上清を回収した。Lowry 法(67)に従いタンパク定量を行った後、20 μg protein をチューブに移し、反応液とした。さらに、Cofactor-Buffer 5 μL を加え、0.1 M Tris-HCl を加えて全量を 50 μL としたのち、37°C の温浴上で 10 分間反応させた。サンプルに内標準物質 d4-PGE₂ を含むアセトニトリルを 50 μL 添

加し、反応を停止させた。ギ酸水溶液を添加後（終濃度 0.2% (v/v)）、等量の酢酸エチルを添加し、10 分間激しく混合し、PGE₂を抽出した。上清を蒸発乾固させた後、0.1% (v/v) ギ酸水溶液/アセトニトリル(1:1, v/v)で再構築し、LC-MS/MS により測定した。熱処理(95°C、5 min) した細胞溶解液に cofactor-buffer を加え 37°C で 10 min インキュベートしたものをブランクとし、すべてのサンプルから差し引いて解析した。

Cofactor-buffer

Hemin	10 μM
Glutathion	10 mM
Arachidonic Acid	100 μM
Tris-HCl	0.1 M

腹腔 Mφ および RAW264 細胞からの PGE₂ 分泌試験

WT マウスと *Slco2a1*^{-/-} マウスから採取した腹腔 Mφ および RAW264 細胞 (1×10⁶ cells/well) をそれぞれ 4 well プレートに播種し 1 日間培養後、接着した細胞を PBS により 2 回洗浄した。その後、1 μg/mL LPS をそれぞれ無血清の D-MEM 培地 300 μL で処置した。所定時間経過後、培地および各 well の細胞を回収し、PGE₂ および PGE₂ 代謝物を LC-MS/MS で測定した。

Mφ 培養上清および細胞懸濁液からの PGE₂ 抽出

LC-MS/MS による定量のため、培養上清中および細胞中の PGE₂ を抽出した。培養上清 200 μL および細胞懸濁液 400 μL に内標準物質である PGE₂-d₄ を含むギ酸水溶液を添加した（終濃度 0.2% (v/v)）。さらに、等量の酢酸エチルを添加し、15 分間激しく混合した。遠心操作 (15,000 rpm、15 min、4°C) により上層を回収し、減圧乾燥装置 Savant™ SPD2010 (Thermo Fisher Scientific、Waltham、MA) により蒸発乾固した。0.1% (v/v) ギ酸水溶液/アセトニトリル (1:1、v/v) で再構築し、LC-MS/MS により定量した。

LC-MS/MS による PGE₂ および PGE₂ 代謝物の定量

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は、液相ポンプに LC-30AD、オートサンプラーに SIL-30AC (Shimadzu Corporation、Kyoto) を用いた。カラムは Mercury MS (C18、20×4.0 mm、Luna 3 μm; Phenomenex、Torrance、CA) を用いて、0.1% (v/v) ギ酸水溶液 (A) とアセトニトリル (B) で移動相を構成したグラジエント法により分析した。グラジエントの組成は、25-99% B (0-5 min)、99% B (5-7 min)、95-25% B (7-9 min) として、流速は 0.3 mL/min、注入量は 30 μL とした。

質量分析器 (MS) は、Shimadzu LCMS-8050 triple quadrupole mass spectrometer (Shimadzu

Corporation、Kyoto) を使用し、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法 (Polarity: negative) によって分析した。d4-15-keto PGE₂ および d4-13, 14-dihydro-15-keto PGA₂ は市販されていないため、構造式から Q1/Q3 (m/z) を推測した。d4-PGE₂ の Q1/Q3 (m/z) は 355.00/275.25、d4-15-keto PGE₂ は 353.05/291.10、d4-13, 14-dihydro-15-keto PGE₂ は 355.10/179.25、d4-13, 14-dihydro-15-keto PGA₂ は 337.25/179.30、PGE₂ の Q1/Q3 (m/z) は 351.00/271.35、15-keto PGE₂ は 349.05/287.10、13, 14-dihydro-15-keto PGE₂ は 351.10/175.25、13, 14-dihydro-15-keto PGA₂ は 333.25/175.30、および d4-PGF₂α (内標準物質) は 357.10/313.25 で測定した。

データ解析

LPS 処置 10 時間後から 14 時間後までの間に産生された PGE₂ 代謝物 (15-keto PGE₂、13, 14-dihydro-15-keto PGE₂、13, 14-dihydro-15-keto PGA₂) の総量 (PGEMs) は以下の式で算出した。

$$\text{PGEMs}_{10-14\text{hr}} (\text{fmol/well}) = \text{PGEMs Amount}_{14\text{hr}} - \text{PGEMs Amount}_{10\text{hr}}$$

産生された PGE₂ 量は細胞内外の PGE₂ と PGEMs の総量とした。産生された PGE₂ 量に対する細胞外 PGE₂ 比、細胞内 PGE₂ 比または総 PGEMs 比は、細胞内外の PGE₂ と PGEMs の総量で細胞外 PGE₂ 量、細胞内 PGE₂ 量または総 PGEMs 量を除して得た。

$$\text{Extracellular PGE}_2 (\%) = \frac{\text{PGE}_2 \text{ Amount}_{\text{Medium}}}{\text{PGE}_2 + \text{PGEMs Amount}_{\text{Cell+Medium}}} \times 100$$

$$\text{Intracellular PGE}_2 (\%) = \frac{\text{PGE}_2 \text{ Amount}_{\text{Cell}}}{\text{PGE}_2 + \text{PGEMs Amount}_{\text{Cell+Medium}}} \times 100$$

$$\text{PGEMs} (\%) = \frac{\text{PGEMs Amount}_{\text{Cell+Medium}}}{\text{PGE}_2 + \text{PGEMs Amount}_{\text{Cell+Medium}}} \times 100$$

統計学的解析は、Student's t-test を用いた。いずれも、 $p < 0.05$ の時に統計的に有意な差があると判断した。

第三節 実験結果

LPS 刺激 RAW264 細胞の d4-PGE₂ 代謝物または PGE₂ 代謝物の産生に対する TGBz の阻害効果

細胞外から取込まれた PGE₂ およびそれ以外の PGE₂ の代謝に対する Oatp2a1 の関与を評価するため、細胞外から取込まれる過程として d4-PGE₂ を RAW264 細胞に添加して、細胞内外の外因性 (Exo) d4-PGE₂、内因性 (Endo) PGE₂ 量および産生された細胞内外の d4-PGE₂ 代謝物量 (d4-PGEMs)、PGE₂ 代謝物量 (PGEMs) を測定した。Exo および Endo の存在比 (Endo/Exo 比) を OATP2A1 阻害剤 TGBz の存在・非存在下で比較することで、Oatp2a1 を介した外因性と内因性の PGE₂ 分布に違いがあるか検討した。TGBz は Oatp2a1 をほぼ完全に阻害する濃度として、25 μ M で用いた(61)。細胞内外の総 PGE₂ 量の Endo/Exo 比はコントロールと TGBz 処置で変化がみられなかった一方、細胞内外の総 PGEMs 量の Endo/Exo 比はコントロールと比較して TGBz 処置により有意に増加した (Table 3)。したがって、Oatp2a1 は取込み過程以外の PGE₂ 分布に関与し、PGE₂ 代謝の調節に働くことが示唆された。

Table 3 Effect of OATP2A1 Inhibitor (TGBz) on PGE₂ and d4-PGE₂ Metabolism by RAW264 Cells.

		PGE ₂ (fmol/well)				PGEMs (fmol/well)			
		Endo		Exo (d4)		Endo		Exo (d4)	
		Control	TGBz	Control	TGBz	Control	TGBz	Control	TGBz
Intracellular		1400	937 [*]	106	64.5 [*]	76.8	25.8 [*]	N.D.	N.D.
Extracellular		15200	15700	1660	1700	188	771 [*]	14.6	13.0
Total		16600	16637	1766	1764.5	264.8	796.8 [*]	14.6	13.0
Total Endo/Exo		Control : 9.40		TGBz : 9.43		Control : 18.1		TGBz: 61.3 [*]	

RAW264 cells were treated with 1 μ g/mL LPS for 10 hours, and then, d4-PGE₂ and OATP2A1 inhibitor (TGBz) were added to the medium at final concentrations of 10 nM and 25 μ M, respectively. 4 hours later, d4-PGE₂, PGE₂, and their metabolites were quantified by LC-MS/MS. Student's t-test was used for statistical analysis (*, $p < 0.05$).

Slco2a1 欠損による腹腔 Mφ の PGE₂ 産生への影響

LPS 刺激による Mφ からの PGE₂ 分泌に対する Oatp2a1 の寄与を評価するため、まず WT および *Slco2a1*^{-/-} マウス由来腹腔 Mφ において PGE₂ 産生能が異なるか、腹腔 Mφ 懸濁液を用いて PGE₂ 産生試験を行った。その結果、WT マウスと比較して *Slco2a1*^{-/-} マウス由来腹腔 Mφ において PGE₂ 産生速度の有意な上昇がみられた (Figure 24)。したがって、Oatp2a1 の機能が抑制されることで PGE₂ 産生が促進することが示唆された。

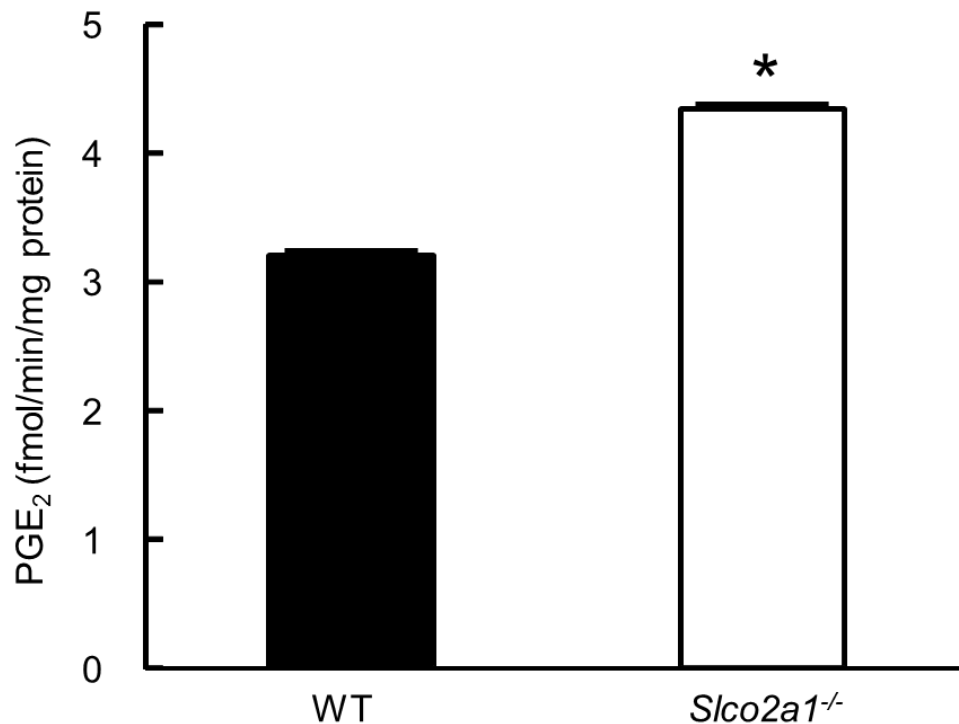


Figure 24 Effect of *Slco2a1* deletion on PGE₂ production in peritoneal Mφs.

Peritoneal Mφs were cultured with LPS (1 μg/ml) for 4 hours and then lysed by sonication in 1 ml of 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0). Soluble fractions of peritoneal Mφ lysate (20 μg protein) were incubated with arachidonic acid (10 μM) for 10 min at 37°C in 50 μL of Tris-HCl buffer (pH 8.0) containing glutathione (1 mM) and hematin (1 μM) as cofactors. After incubation, PGE₂ content was measured by LC-MS/MS. Expression was compared between WT (closed column) and *Slco2a1*^{-/-} (open column) mice, and each point represents the mean + S.E.M. (n = 3). Student's t-test was used for statistical analysis (*, *p* < 0.05).

Slco2a1 欠損による腹腔 Mφ の PGE₂ 代謝・分泌への影響

腹腔 Mφ の PGE₂ 代謝および分泌に対する *Oatp2a1* の寄与を検討した。PGEMs を検出できる時間として、1 μg/mL LPS 処置 4 時間以降の 4、8、12 時間で行った。細胞外 PGE₂ 量は 8、12 時間において、WT マウス由来腹腔 Mφ と比較して *Slco2a1*^{-/-} マウスで有意に減少した (Figure 25A)。一方、細胞内外の PGE₂ と PGEMs の総量も *Slco2a1* 欠損により減少傾向がみられた (Figure 25B)。

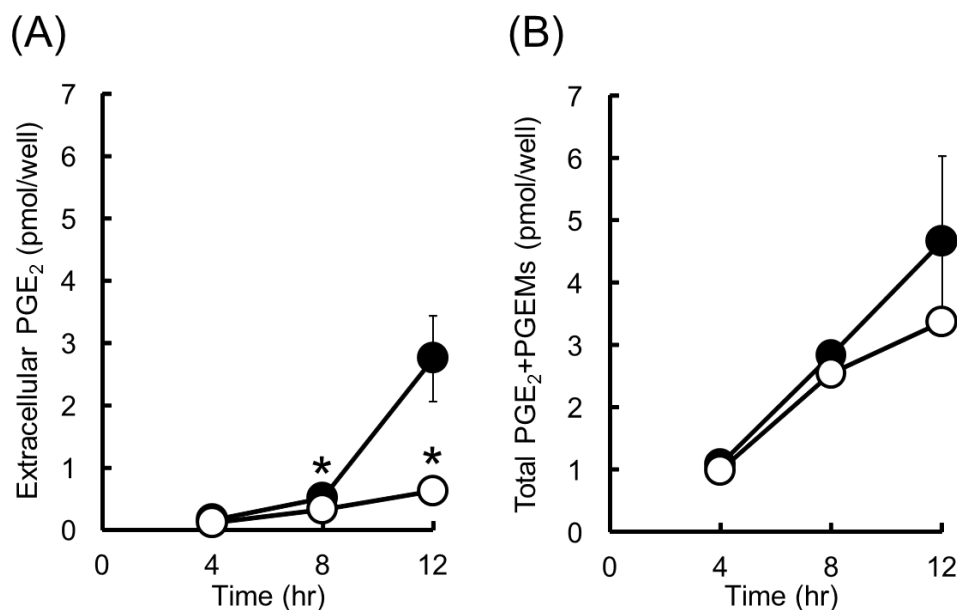


Figure 25 Effect of *Slco2a1* deletion to extracellular PGE₂ and PGE₂ production induced by LPS from peritoneal Mφs.

Effect of LPS activation for 4, 8, and 12 hours on extracellular PGE₂ (A) and total cellular amount of PGE₂ and PGEMs (B) in peritoneal Mφs derived from WT (filled symbols) and *Slco2a1*^{-/-} (open symbols) mice. Each result represents the mean ± S.E.M. (n = 8-12). Student's t-test was used for statistical analysis (*, $p < 0.05$).

腹腔 Mφ の細胞内外 PGE₂ 分布に対する Oatp2a1 の寄与を評価するため、PGE₂ と PGEMs の総量で細胞外 PGE₂ 量および細胞内 PGE₂ 量を除して、細胞外 PGE₂ 比、細胞内 PGE₂ 比を算出した。さらに、PGE₂ 代謝に対する Oatp2a1 の寄与を見積もるために、PGE₂ と PGEMs の総量で総 PGEMs 量を除して、総 PGEMs 比を算出した。その結果、*Slco2a1*^{-/-}マウス由来腹腔 Mφ における総 PGEMs 比は、4、8、12 時間において 45%、36%、33% となり、WT の 39%、26%、19% と比較して有意に増加した (Figure 26A)。一方、*Slco2a1*^{-/-}マウス由来腹腔 Mφ における細胞外 PGE₂ 比は、4、8、12 時間において 12%、15%、20% となり、WT の 16%、21%、38% と比較して減少し、8、12 時間では有意に減少した (Figure 26B)。細胞内 PGE₂ 比は、WT と *Slco2a1*^{-/-}マウスで有意な差がみられなかった (Figure 26C)。以上の結果から、腹腔 Mφ において Oatp2a1 は細胞内外の PGE₂ 分布を調節することで PGE₂ 代謝に関わることを示された。

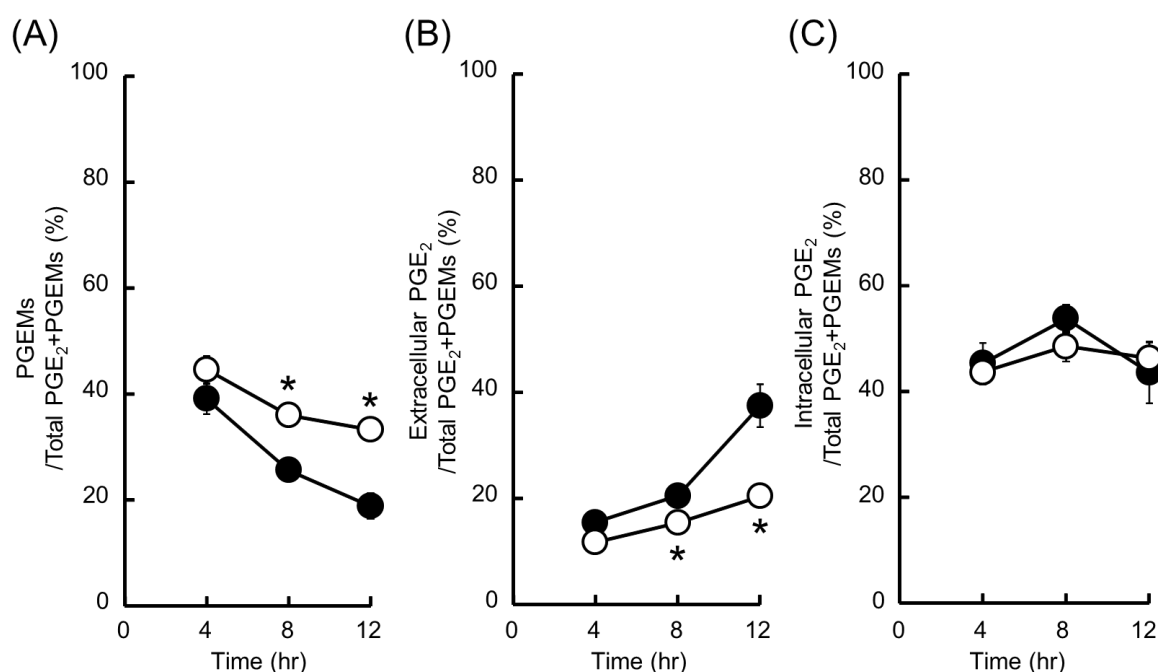


Figure 26 Effect of *Slco2a1* deletion to metabolism and disposition of PGE₂ induced by LPS from peritoneal Mφs.

Effect of LPS activation for 4, 8, and 12 hours on metabolism (A), extracellular disposition of PGE₂ (B) and intracellular disposition of PGE₂ (C) in peritoneal Mφs derived from WT (filled symbols) and *Slco2a1*^{-/-} (open symbols) mice. Each result represents the mean ± S.E.M. (n = 11-15). Student's t-test was used for statistical analysis (*, *p* < 0.05).

RAW264 細胞の PGE₂ 代謝・分泌に対する TGBz の阻害効果

RAW264 細胞の PGE₂ 代謝および分泌に対する Oatp2a1 の寄与を検討するため、1 μ g/mL LPS 処置 4、8、12 時間後の細胞内外の PGE₂ 量および PGEMs 量を測定した。細胞外 PGE₂ 量は 4、8、12 時間の全点において、TGBz 未処置と比較して TGBz 処置により有意に減少した (Figure 27A)。一方、PGE₂ と PGEMs の総量も TGBz 未処置と比較して TGBz 処置により減少し、8、12 時間では有意に減少した (Figure 27B)。

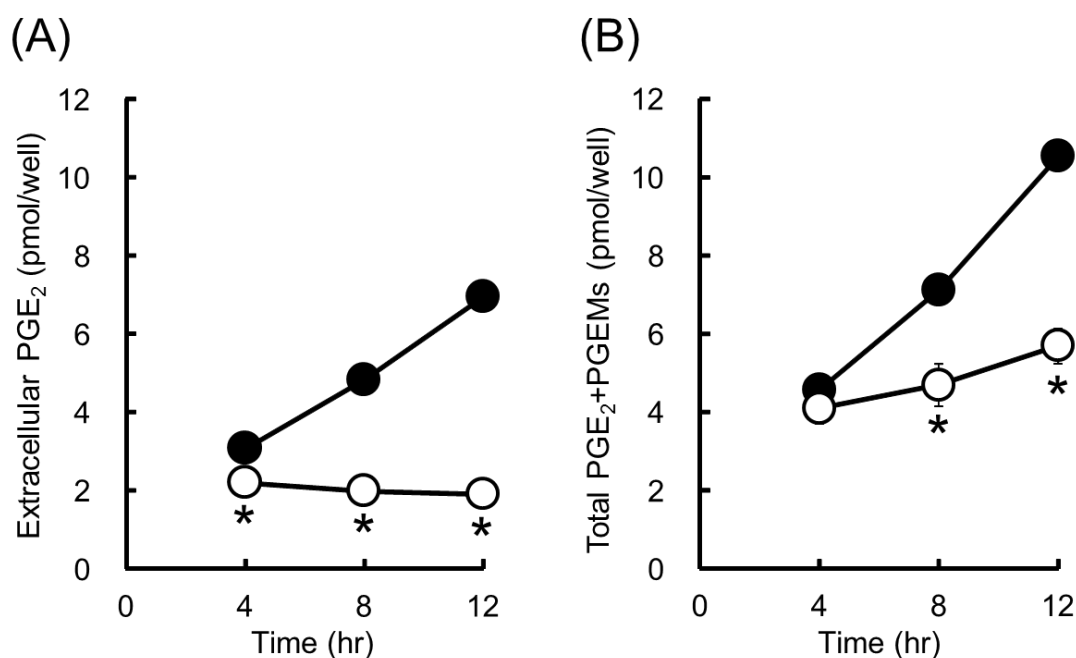


Figure 27 Effect of TGBz to extracellular PGE₂ and PGE₂ production induced by LPS from RAW264 cells.

Effect of LPS activation for 4, 8, and 12 hours on extracellular PGE₂ (A) and total cellular amount of PGE₂ and PGEMs (B) in RAW264 cells in the absence (filled symbols) or presence (open symbols) of 25 μ M TGBz. Each result represents the mean \pm S.E.M. (n = 10-12). Student's t-test was used for statistical analysis (*, $p < 0.05$).

RAW264 細胞の細胞内外 PGE₂ 分布に対する Oatp2a1 の寄与を評価するため、PGE₂ と PGEMs の総量で細胞外 PGE₂ 量および細胞内 PGE₂ 量を除いて、細胞外 PGE₂ 比、細胞内 PGE₂ 比を算出した。さらに、PGE₂ 代謝に対する Oatp2a1 の寄与を見積もるために、PGE₂ と PGEMs の総量で総 PGEMs 量を除いて、総 PGEMs 比を算出した。その結果、TGBz 処置 RAW264 細胞における総 PGEMs 比は、4、8、12 時間において 41%、37%、41% となり、未処置の 18%、18%、19% と比較して有意に増加した (Figure 28A)。一方、TGBz 処置 RAW264 細胞における細胞外 PGE₂ 比は、4、8、12 時間において 55%、43%、34% となり、未処置の 67%、68%、66% と比較して有意に減少した (Figure 28B)。細胞内 PGE₂ 比は、4、12 時間において未処置と比較して TGBz 処置により有意な差がみられた (Figure 28C)。以上の結果から、腹腔 Mφ と同様に RAW264 細胞においても Oatp2a1 は細胞内外の PGE₂ 分布を調節することで PGE₂ 代謝に関与することが示された。

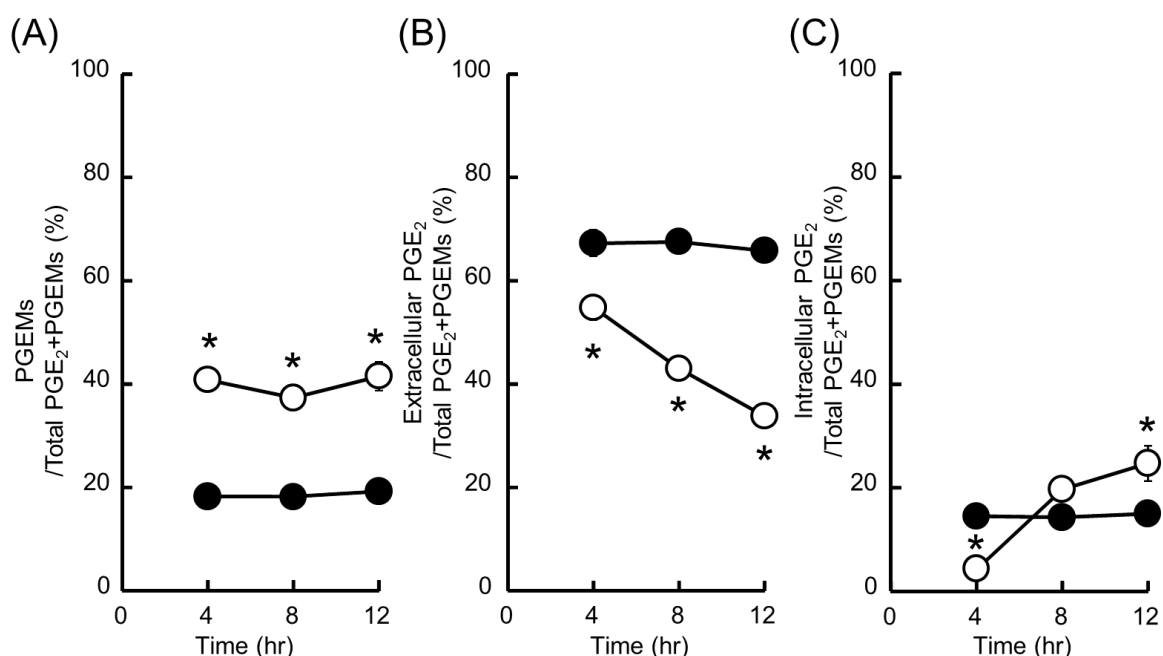


Figure 28 Effect of TGBz to metabolism and disposition of PGE₂ induced by LPS from RAW264 cells.

Effect of LPS activation for 4, 8, and 12 hours on metabolism (A), extracellular disposition of PGE₂ (B) and intracellular disposition of PGE₂ (C) in RAW264 cells in the absence (filled symbols) or presence (open symbols) of 25 μM TGBz. Each result represents the mean ± S.E.M. (n = 10-12). Student's t-test was used for statistical analysis (*, *p* < 0.05).

PGE₂分泌の初期段階における Oatp2a1 の影響

PGE₂ 分泌に対する OATP2A1 の影響において、PGEMs を検出するために LPS 処置 4 時間以降で評価を行った結果、Oatp2a1 の細胞外 PGE₂ 分泌への関与が示唆された (Figure 28)。PGE₂ 分泌の初期段階においても Oatp2a1 は PGE₂ 分泌に寄与するかを評価するため、PGE₂ を検出できるまで上昇させる目的で 10 μ M AA 処置し、1 μ g/mL LPS 処置 10 分後の WT と *Slco2a1*^{-/-} マウス由来腹腔 M ϕ の細胞内外の PGE₂ 量を測定した。細胞内外の総 PGE₂ 量で細胞外 PGE₂ 量を除して、総 PGE₂ 量に対する細胞外 PGE₂ 比を算出した結果、細胞外 PGE₂ 比は、*Slco2a1*^{-/-} マウス由来腹腔 M ϕ は 63% であり WT マウスの 70% と比較して有意に減少した (Figure 29)。したがって、Oatp2a1 は腹腔 M ϕ からの PGE₂ 分泌の初期段階においても分泌に寄与することが示された。

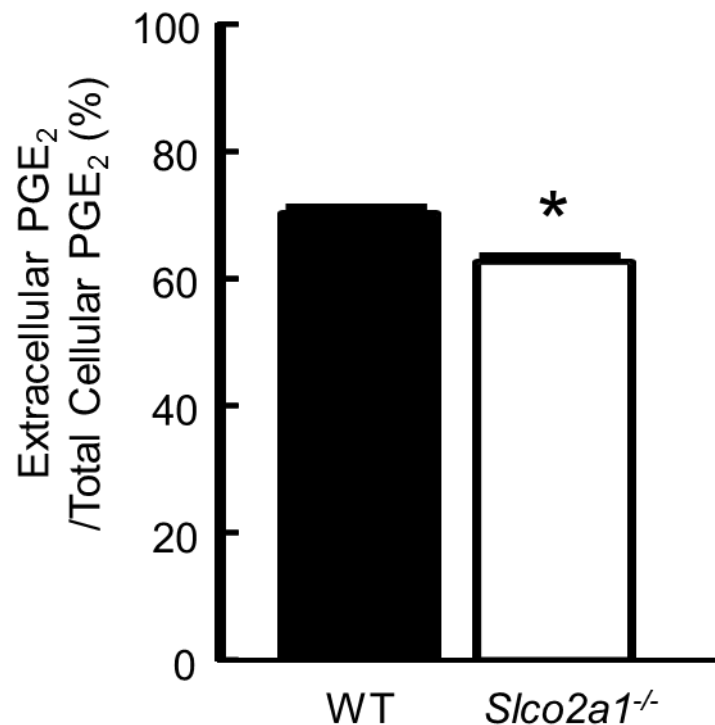


Figure 29 Effect of *Slco2a1* deletion to extracellular disposition of PGE₂ induced by LPS from peritoneal M ϕ s.

Effect of LPS activation for 10 min on extracellular disposition of PGE₂ in 10 μ M AA-treated peritoneal M ϕ s derived from WT (closed column) and *Slco2a1*^{-/-} (open column) mice. Each result represents the mean + S.E.M. (n = 4). Student's t-test was used for statistical analysis (*, $p < 0.05$).

また RAW264 細胞においても、マウス由来腹腔 Mφ と同様に検討を行った。RAW264 細胞は AA 非存在下で十分 PGE₂ を検出できることから、PGE₂ 分泌の初期段階においても Oatp2a1 は PGE₂ 分泌に寄与するかを評価するため、1 μg/mL LPS 処置 10 分後の TGBz 処置と未処置 RAW264 細胞の細胞内外の PGE₂ 量を測定した。細胞内外の総 PGE₂ 量で細胞外 PGE₂ 量を除して、総 PGE₂ 量に対する細胞外 PGE₂ 比を算出した結果、TGBz 処置における細胞外 PGE₂ 比は 23% であり、TGBz 未処置の 50% と比較して有意に減少した (Figure 30)。以上の結果から、腹腔 Mφ および RAW264 細胞において Oatp2a1 は LPS 刺激初期の PGE₂ 分泌に関与することが示された。

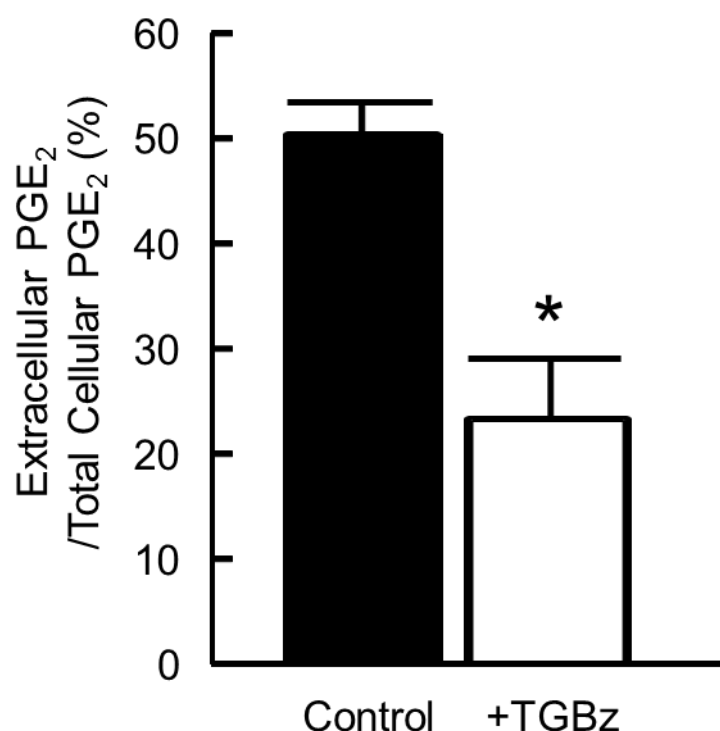


Figure 30 Effect of TGBz to extracellular disposition of PGE₂ induced by LPS from RAW264 cells.

Effect of LPS activation for 10 min on extracellular disposition of PGE₂ in RAW264 cells in the absence (closed column) or presence (open column) of 25 μM TGBz. Each result represents the mean + S.E.M. (n = 4). Student's t-test was used for statistical analysis (*, $p < 0.05$).

第四節 考察

本章では M ϕ の炎症性刺激による PGE₂ 分泌および代謝における細胞内 OATP2A1 の役割を検討することを目的に、*Slco2a1*^{-/-}マウス由来の腹腔 M ϕ または OATP2A1 阻害剤 TGBz 処置 RAW264 細胞における LPS 刺激後の細胞内外 PGE₂ と PGEMs (15-keto PGE₂、13, 14-dihydro-15-keto PGE₂、および 13, 14-dihydro-15-keto PGA₂) を LC-MS/MS で測定して評価した。PGE₂ の分泌過程において、代謝酵素による PGE₂ の不活性化における OATP2A1 の関与を評価することを目的に、細胞外から取込まれる過程として d4-PGE₂ を RAW264 細胞に添加して、産生される d4-PGEMs および内因性 PGEMs を OATP2A1 阻害剤の存在・非存在下で比較した (Table 3)。TGBz 処置により細胞内外の総 PGEMs 量の Endo/Exo 比はコントロールと比較して有意に増加したことから、分泌過程における PGE₂ の不活性化に OATP2A1 が関与することが示唆された。

LPS 刺激による M ϕ からの PGE₂ 分泌および代謝に対するの寄与を評価するため、まず WT と *Slco2a1*^{-/-}マウス由来腹腔 M ϕ で PGE₂ 産生能自体に変化がないか検討した。PGE₂ 産生試験の結果、WT マウスと比較して *Slco2a1*^{-/-}マウス由来腹腔 M ϕ において PGE₂ 産生速度の有意な上昇がみられた (Figure 24)。したがって、*Oatp2a1* の機能が抑制されることで PGE₂ 産生が促進することが示唆された。

そこで、M ϕ の細胞内外 PGE₂ 分布に対する *Oatp2a1* の寄与を評価するため、PGE₂ と PGEMs の総量 (産生された PGE₂ 量) で細胞外 PGE₂ 量を除して、細胞外 PGE₂ 比を算出した (Figure 26、28)。さらに、PGE₂ 代謝に対する *Oatp2a1* の寄与を見積もるために、PGE₂ と PGEMs の総量で総 PGEMs 量を除して、PGEMs 比を算出した。PGEMs を検出できる時間として、1 μ g/mL LPS 処置 4 時間以降の 4、8、12 時間で検討を行った。その結果、*Slco2a1*^{-/-}マウス由来腹腔 M ϕ における総 PGEMs 比は、4、8、12 時間において 45%、36%、33% となり、WT の 39%、26%、19% と比較して有意に増加した (Figure 26A)。一方、*Slco2a1*^{-/-}マウス由来腹腔 M ϕ における細胞外 PGE₂ 比は、12%、15%、20% となり、WT の 16%、21%、38% と比較して減少し、8、12 時間では有意に減少した (Figure 26B)。TGBz 処置 RAW264 細胞における総 PGEMs 比も、4、8、12 時間において 41%、37%、41% となり、未処置の 18%、18%、19% と比較して有意に増加した (Figure 28A)。一方、TGBz 処置 RAW264 細胞における細胞外 PGE₂ 比は、55%、43%、34% となり、未処置の 67%、68%、66% と比較して有意に減少した (Figure 28B)。以上の結果から、M ϕ の *Oatp2a1* 活性を抑制した時、PGE₂ と PGEMs の総量に対する細胞外 PGE₂ 比が減少し、総代謝物比が増加することが示された。しかし、*Oatp2a1* の機能を抑制した際に、細胞内の PGE₂ は完全に消失していないことから (Figure 26C、28C)、他の輸送体によって小胞内に PGE₂ が貯留されていることや、代謝酵素が飽和していると考えられた。また、*Oatp2a1* の機能を抑制した際にも細胞外に PGE₂ が存在していたことから、M ϕ の PGE₂ 分泌機構は *Oatp2a1* 介在性のメカニズム以外にも存在することが示唆された。さらに、PGE₂ 分泌の初期段階においても *Oatp2a1* は PGE₂ 分泌に寄与するかを評価するため、

1 $\mu\text{g/mL}$ LPS 処置 10 分後の細胞内外の PGE_2 量を測定した。腹腔 $\text{M}\phi$ および RAW264 細胞において OATP2A1 活性を抑制した際、 PGE_2 と PGEMs の総量に対する細胞外 PGE_2 比の減少がみられたことから (Figure 29、30)、 $\text{M}\phi$ の PGE_2 分泌の初期段階においても Oatp2a1 は PGE_2 分泌に関与することが示された。

LPS を 4、8、12 時間処置した際の PGE_2 と PGEMs の総量に関して、*Slco2a1*^{-/-}マウス由来腹腔 $\text{M}\phi$ または TGBz 処置 RAW264 細胞において WT マウスまたは TGBz 未処置群と比較して総量の減少がみられた (Figure 25、29)。この要因として、以下の点が挙げられる。 PGE_2 は EP に作用することで COX-2 の発現を誘導し、その結果として PGE_2 の合成が上昇することが報告されている(25)。Oatp2a1 機能抑制によりこのポジティブフィードバック機構が抑制されることで、LPS 処置 4、8、12 時間後においては、WT マウス由来腹腔 $\text{M}\phi$ および TGBz 未処置 RAW264 細胞と比較して *Slco2a1*^{-/-}マウス由来腹腔 $\text{M}\phi$ および TGBz 処置 RAW264 細胞で PGE_2 合成が低下していたことが考えられる。したがって、Oatp2a1 の機能を長時間抑制することで、 PGE_2 合成が抑制され、 PGE_2 シグナルが低下することが示唆された。もう一つの可能性として、今回測定していない他の PGE_2 代謝物が生成していることが考えられる。 PGE_2 および 13, 14-dihydro-15-keto PGE_2 は肝臓において β あるいは ω 酸化を受けること(99, 100)、13, 14-dihydro-15-keto PGE_2 は血漿中で 8-iso-13,14-dihydro-15-keto PGE_2 に変換されること(101)、13, 14-dihydro-15-keto PGA_2 はアルブミン存在下または pH 7 以上の溶液中で bicyclo PGE_2 になることが報告されている(100, 102)。しかし、 $\text{M}\phi$ 内 PGE_2 代謝については、脱水素酵素 15-PGDH による不活性化が一般的に支持されており、それ以外の代謝物の生成に関する情報はない。

第一章と第二章での検討において、LPS および EPA-E 処置および高週齢 *Slco2a1*^{-/-}マウスの脾臓 PGE_2 量が WT マウスと比較して低下した要因として、脾臓 $\text{M}\phi$ に発現する Oatp2a1 を介した細胞内酸性コンパートメント内への PGE_2 取込みが消失し、細胞質の代謝酵素による PGE_2 の不活性化が促進したことが示唆された。さらに、高週齢 *Slco2a1*^{-/-}マウスでみられた脾臓の肥大化メカニズムとして、*Slco2a1* 欠損により脾臓 $\text{M}\phi$ からの PGE_2 分泌が低下し、細胞外 PGE_2 量が低下することで、 PGE_2 の免疫細胞に対する免疫抑制作用が低下し炎症が増悪したことが示唆された。本研究により、生体内において OATP2A1 は PGE_2 の細胞内取込みのみならず、 PGE_2 の分泌にも機能することを提唱することができ、生体内において脾臓 $\text{M}\phi$ の OATP2A1 を介した PGE_2 分泌は免疫・炎症反応の調節に関与することが示唆された。

生体内の OATP2A1 の機能を予測するためには、発現量のみならず細胞における局在部位を考慮して考える必要がある。今後、 $\text{M}\phi$ における OATP2A1 の発現部位の同定を行い、駆動力や PGs に対する親和性など輸送特性を詳細に検討していく必要がある。さらに、炎症性疾患モデルにおける OATP2A1 機能抑制による効果と副作用を検討することで、OATP2A1 が治療標的となり得るか検証していく必要がある。

結論

本研究により、生体内において OATP2A1 は PGE₂ の細胞内取込みのみならず、PGE₂ の分泌にも機能することを提唱することができ、生体内において脾臓 Mφ の OATP2A1 を介した PGE₂ 分泌は免疫・炎症反応の調節に関与することが示唆された。

PGE₂ は、細胞内で ω -6 系脂肪酸 AA から COX-2 および PGES を介して産生され細胞外で EP に作用し、炎症や免疫応答を媒介する。PGE₂ 輸送体の OATP2A1/*SLCO2A1* は全身の組織に広く発現し、PGE₂ を細胞内に取込み、細胞質の代謝酵素による PGE₂ の不活性化を促進する。一方当研究室では、Mφ においては OATP2A1 が細胞内コンパートメント に発現し、PGE₂ の細胞外への分泌に関与することを示した。したがって、PGE₂ の生理作用に対する OATP2A1 の生理的役割を解明するためには、細胞あるいは組織ごとに OATP2A1 の発現と PGE₂ 動態を関連付ける必要がある。そこで、本研究では、炎症時 AA 由来 PGE₂ と同時に ω -3 系脂肪酸のエイコサペンタエン酸から産生される PGE₃ が抗 PGE₂ 作用を有することに着目し、生体内の PGE₂ および PGE₃ 分布や PGE₂ の作用における OATP2A1 の役割について検討した。さらに、Mφ が多く存在する脾臓において *Slco2a1*^{-/-}マウスの組織 PGE₂ および PGE₂ 量が WT マウスと比べて低下したため、脾臓における Mφ からの PGE₂ 分泌に寄与する OATP2A1 の生理的役割を検証した。

第一章では、炎症時 PGE₂ および PGE₃ の組織分布や PGE₂ の作用における OATP2A1 の役割について検討した。PGE₃ は OATP2A1 の基質となり、*Slco2a1*^{-/-}マウスにおいて肺では PGE₂ および PGE₃ 量が増加し、逆に脾臓では低下する変動がみられたことから、OATP2A1 の機能は肺と脾臓における PGE₂ および PGE₃ 分布に相反する様式で反映されることが示された。PGE₂ 輸送に対する PGE₃ の IC₅₀ 値は 0.590 μ M であり、LPS および EPA-E を処置した WT マウスの肺の PGE₃ 濃度は 0.009 μ M、脾臓の PGE₃ 濃度は 0.8 μ M であったことから、脾臓において PGE₃ は OATP2A1 を介した PGE₂ 分泌輸送を低下させることで PGE₂ の代謝・分解を促進し、その結果 PGE₂ の作用を抑制すると考えられた。PGE₂ は免疫細胞の増殖、分化および活性調節に関与し、免疫抑制作用を示すことから、OATP2A1 は脾臓の PGE₂ 量を調節し、生体内の免疫応答に重要な役割を担っていることが考えられた。

そこで第二章では、OATP2A1 による脾臓内 PGE₂ 調節の意義について検討した。脾臓において、*Oatp2a1* は杆状細胞および赤脾髄に存在する Mφ に発現することが示された。また、*Oatp2a1* の機能が抑制されることで組織 PGE₂ 量が低下する要因として、杆状細胞の *Oatp2a1* を介した血中から杆状細胞内への PGE₂ 取込みが消失したこと、および脾臓 Mφ に発現する *Oatp2a1* を介した PGE₂ 分泌の消失により細胞質の代謝酵素による PGE₂ の不活性化が促進したと考えられた。EPA-E および LPS 処置 WT マウスにおいて脾臓中濃度は血中濃度に比べて 2,770 倍以上であり、脾臓の PGE₂ は主に脾臓内で産生されていると考えられた。したがって、*Slco2a1* 欠損による PGE₂ 量の低下において、血中から杆状細胞内への PGE₂ 取込みよりも、脾臓 Mφ の OATP2A1 を介した PGE₂ 分泌の寄与が大きいことが示唆された。免疫反

応の活発化に伴い脾臓の肥大化が引き起こされることが、PGE₂は免疫抑制作用を示すことから、本研究で見出した OATP2A1 の活性低下が引き起こす脾臓 PGE₂ 量の低下は、炎症反応の増悪による脾臓の肥大化を引き起こすことが想定された。炎症反応の増悪による脾臓の肥大化における OATP2A1 の役割について、急性炎症モデルとして LPS を腹腔内投与したマウス、および加齢により様々な組織に慢性的な炎症が惹起されることから高週齢マウス（42-88 週齢）を用いて WT と *Slco2a1*^{-/-}マウスの脾臓の相対重量を比較した結果、高週齢の WT マウスと比較して *Slco2a1*^{-/-}マウスで脾臓の肥大化がみられたが、LPS 誘発性急性炎症モデルでは両マウス間で差はみられなかった。したがって、*Slco2a1* 欠損により脾臓 Mφ からの PGE₂ 分泌が低下し、PGE₂ の免疫抑制作用が低下したことが示唆され、加齢に伴う慢性炎症の増悪が推測された。今後、OATP2A1 の機能が慢性炎症の発症や程度に与える影響について、検討が必要とされる。

第三章では、*Slco2a1* 欠損による脾臓 PGE₂ 量の低下は、Mφ の細胞内 Oatp2a1 を介した酸性コンパートメント内への PGE₂ 取込みが消失し、細胞質の代謝酵素による PGE₂ の不活性化が促進したことによるという仮説を検証することを目的とした。*Slco2a1*^{-/-}マウス由来腹腔 Mφ と OATP2A1 阻害剤 (TGBz) 処置 RAW264 細胞を用いた検討により、Mφ の Oatp2a1 活性を抑制した時、PGE₂ と代謝物の総量に対する細胞外 PGE₂ 比の減少、総代謝物比の増加が観察された。したがって、細胞内において OATP2A1 は PGE₂ の動態を調節し、代謝酵素による不活性化から PGE₂ を保護し、炎症反応を円滑に媒介できるように効果的な PGE₂ 分泌を調整することが初めて示唆された。したがって、生体内において脾臓 Mφ の OATP2A1 を介した PGE₂ 分泌は、加齢に伴う慢性炎症に関与することが示唆された。したがって、細胞内 OATP2A1 は PGE₂ の分泌を通じて PGE₂ 代謝の抑制に作用することが新たな機能として示され、生体内において脾臓 Mφ の OATP2A1 を介した PGE₂ 分泌は脾臓の組織および局所 PGE₂ 濃度調節に関わり、加齢に伴う慢性炎症に関与することが示唆された。

以上、本研究では *Slco2a1* 欠損マウスで組織 PGE₂ 量が低下した脾臓に着目し、OATP2A1 が有する PGE₂ 分泌機能を解析した。その結果、Oatp2a1 は脾臓内の Mφ に発現すること、そして炎症時の PGE₂ 分泌に働き、その結果慢性炎症の増悪抑制に働くことを示すことができた。さらに、OATP2A1 は PGE₃ にも親和性を有することから、PGE₃ による OATP2A1 を介した PGE₂ の作用調節の可能性についても示唆することができた。

引用文献

1. Huwiler A, Pfeilschifter J. Lipids as targets for novel anti-inflammatory therapies. *Pharmacol Ther* 2009;124:96-112.
2. Aoki M, Aoki H, Ramanathan R, Hait NC, Takabe K. Sphingosine-1-Phosphate Signaling in Immune Cells and Inflammation: Roles and Therapeutic Potential. *Mediators Inflamm* 2016;2016:8606878.
3. Yang P, Jiang Y, Fischer SM. Prostaglandin E3 metabolism and cancer. *Cancer Lett* 2014;348:1-11.
4. Calder PC. n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am J Clin Nutr* 2006;83:1505S-19S.
5. Bito LZ, Baroody RA. Impermeability of rabbit erythrocytes to prostaglandins. *Am J Physiol* 1975;229:1580-4.
6. Kanai N, Lu R, Satriano JA, Bao Y, Wolkoff AW, Schuster VL. Identification and characterization of a prostaglandin transporter. *Science* 1995;268:866-9.
7. Pucci ML, Bao Y, Chan B, et al. Cloning of mouse prostaglandin transporter PGT cDNA: species-specific substrate affinities. *Am J Physiol* 1999;277:R734-41.
8. Tamai I, Nezu J, Uchino H, et al. Molecular identification and characterization of novel members of the human organic anion transporter (OATP) family. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;273:251-60.
9. Kullak-Ublick GA, Ismail MG, Stieger B, et al. Organic anion-transporting polypeptide B (OATP-B) and its functional comparison with three other OATPs of human liver. *Gastroenterology* 2001;120:525-33.
10. Shiraya K, Hirata T, Hatano R, et al. A novel transporter of SLC22 family specifically transports prostaglandins and co-localizes with 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase in renal proximal tubules. *J Biol Chem* 2010;285:22141-51.
11. Kobayashi Y, Nojima J, Ohbayashi M, Kohyama N, Yamamoto T. [Molecular cloning and functional characterization of a novel gene encoding human prostaglandin carrier, hPrC]. *Yakugaku Zasshi* 2011;131:1493-501.
12. Seward DJ, Koh AS, Boyer JL, Ballatori N. Functional complementation between a novel mammalian polygenic transport complex and an evolutionarily ancient organic solute transporter, OSTalpha-OSTbeta. *J Biol Chem* 2003;278:27473-82.

13. Reid G, Wielinga P, Zelcer N, et al. The human multidrug resistance protein MRP4 functions as a prostaglandin efflux transporter and is inhibited by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:9244-9.
14. Lu R, Kanai N, Bao Y, Schuster VL. Cloning, in vitro expression, and tissue distribution of a human prostaglandin transporter cDNA(hPGT). *J Clin Invest* 1996;98:1142-9.
15. Piper PJ, Vane JR, Wyllie JH. Inactivation of prostaglandins by the lungs. *Nature* 1970;225:600-4.
16. Bleasby K, Castle JC, Roberts CJ, et al. Expression profiles of 50 xenobiotic transporter genes in humans and pre-clinical species: a resource for investigations into drug disposition. *Xenobiotica* 2006;36:963-88.
17. Chan BS, Endo S, Kanai N, Schuster VL. Identification of lactate as a driving force for prostanoid transport by prostaglandin transporter PGT. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002;282:F1097-102.
18. Nomura T, Lu R, Pucci ML, Schuster VL. The two-step model of prostaglandin signal termination: in vitro reconstitution with the prostaglandin transporter and prostaglandin 15 dehydrogenase. *Mol Pharmacol* 2004;65:973-8.
19. Morita I, Schindler M, Regier MK, et al. Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2. *J Biol Chem* 1995;270:10902-8.
20. Spencer AG, Woods JW, Arakawa T, Singer, II, Smith WL. Subcellular localization of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2 by immunoelectron microscopy. *J Biol Chem* 1998;273:9886-93.
21. Tatsuguchi A, Sakamoto C, Wada K, et al. Localisation of cyclooxygenase 1 and cyclooxygenase 2 in *Helicobacter pylori* related gastritis and gastric ulcer tissues in humans. *Gut* 2000;46:782-9.
22. Tanaka K, Furuyashiki T, Kitaoka S, et al. Prostaglandin E2-mediated attenuation of mesocortical dopaminergic pathway is critical for susceptibility to repeated social defeat stress in mice. *J Neurosci* 2012;32:4319-29.
23. Matsuoka Y, Furuyashiki T, Bito H, et al. Impaired adrenocorticotrophic hormone response to bacterial endotoxin in mice deficient in prostaglandin E receptor EP1 and EP3 subtypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:4132-7.

24. Ushikubi F, Sugimoto Y, Ichikawa A, Narumiya S. Roles of prostanoids revealed from studies using mice lacking specific prostanoid receptors. *Jpn J Pharmacol* 2000;83:279-85.
25. Sonoshita M, Takaku K, Sasaki N, et al. Acceleration of intestinal polyposis through prostaglandin receptor EP2 in Apc(Delta 716) knockout mice. *Nat Med* 2001;7:1048-51.
26. Kabashima K, Saji T, Murata T, et al. The prostaglandin receptor EP4 suppresses colitis, mucosal damage and CD4 cell activation in the gut. *J Clin Invest* 2002;109:883-93.
27. Amano H, Hayashi I, Endo H, et al. Host prostaglandin E(2)-EP3 signaling regulates tumor-associated angiogenesis and tumor growth. *J Exp Med* 2003;197:221-32.
28. Hodges RJ, Jenkins RG, Wheeler-Jones CP, et al. Severity of lung injury in cyclooxygenase-2-deficient mice is dependent on reduced prostaglandin E(2) production. *Am J Pathol* 2004;165:1663-76.
29. Nakanishi M, Perret C, Meuillet EJ, Rosenberg DW. Non-cell autonomous effects of targeting inducible PGE2 synthesis during inflammation-associated colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2015;36:478-86.
30. Loftin CD, Trivedi DB, Tiano HF, et al. Failure of ductus arteriosus closure and remodeling in neonatal mice deficient in cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:1059-64.
31. Kojima F, Frolov A, Matnani R, Woodward JG, Crofford LJ. Reduced T cell-dependent humoral immune response in microsomal prostaglandin E synthase-1 null mice is mediated by nonhematopoietic cells. *J Immunol* 2013;191:4979-88.
32. Akitake Y, Nakatani Y, Kamei D, et al. Microsomal prostaglandin E synthase-1 is induced in alzheimer's disease and its deletion mitigates alzheimer's disease-like pathology in a mouse model. *J Neurosci Res* 2013;91:909-19.
33. Chang HY, Locker J, Lu R, Schuster VL. Failure of postnatal ductus arteriosus closure in prostaglandin transporter-deficient mice. *Circulation* 2010;121:529-36.
34. Chi Y, Khersonsky SM, Chang YT, Schuster VL. Identification of a new class of prostaglandin transporter inhibitors and characterization of their biological effects on prostaglandin E2 transport. *J Pharmacol Exp Ther*

2006;316:1346-50.

35. Chi Y, Min J, Jasmin JF, Lisanti MP, Chang YT, Schuster VL. Development of a high-affinity inhibitor of the prostaglandin transporter. *J Pharmacol Exp Ther* 2011;339:633-41.
36. Chi Y, Jasmin JF, Seki Y, et al. Inhibition of the Prostaglandin Transporter PGT Lowers Blood Pressure in Hypertensive Rats and Mice. *PLoS One* 2015;10:e0131735.
37. Liu Z, Benard O, Syeda MM, Schuster VL, Chi Y. Inhibition of Prostaglandin Transporter (PGT) Promotes Perfusion and Vascularization and Accelerates Wound Healing in Non-Diabetic and Diabetic Rats. *PLoS One* 2015;10:e0133615.
38. Yerushalmi GM, Markman S, Yung Y, et al. The prostaglandin transporter (PGT) as a potential mediator of ovulation. *Sci Transl Med* 2016;8:338ra68.
39. Nakanishi T, Hasegawa Y, Mimura R, et al. Prostaglandin Transporter (PGT/SLCO2A1) Protects the Lung from Bleomycin-Induced Fibrosis. *PLoS One* 2015;10:e0123895.
40. Zhang Z, Xia W, He J, et al. Exome sequencing identifies SLCO2A1 mutations as a cause of primary hypertrophic osteoarthropathy. *Am J Hum Genet* 2012;90:125-32.
41. Zhang Z, He JW, Fu WZ, Zhang CQ, Zhang ZL. Mutations in the SLCO2A1 gene and primary hypertrophic osteoarthropathy: a clinical and biochemical characterization. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98:E923-33.
42. Cheng R, Li M, Guo Y, Yao Y, Gao C, Yao Z. Three novel mutations in the SLCO2A1 gene in two Chinese families with primary hypertrophic osteoarthropathy. *Eur J Dermatol* 2013;23:636-9.
43. Umeno J, Hisamatsu T, Esaki M, et al. A Hereditary Enteropathy Caused by Mutations in the SLCO2A1 Gene, Encoding a Prostaglandin Transporter. *PLoS Genet* 2015;11:e1005581.
44. Shimada H, Nakamura Y, Nakanishi T, Tamai I. OATP2A1/SLCO2A1-mediated prostaglandin E2 loading into intracellular acidic compartments of macrophages contributes to exocytotic secretion. *Biochem Pharmacol* 2015;98:629-38.
45. Stenson WF, Parker CW. Prostaglandins, macrophages, and immunity. *J Immunol* 1980;125:1-5.
46. Davies LC, Jenkins SJ, Allen JE, Taylor PR. Tissue-resident

- macrophages. *Nat Immunol* 2013;14:986-95.
47. Montrose DC, Nakanishi M, Murphy RC, et al. The role of PGE2 in intestinal inflammation and tumorigenesis. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2014;116-117:26-36.
 48. Dyerberg J, Bang HO, Stoffersen E, Moncada S, Vane JR. Eicosapentaenoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis? *Lancet* 1978;2:117-9.
 49. Dyerberg J, Bang HO. A hypothesis on the development of acute myocardial infarction in Greenlanders. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 1982;161:7-13.
 50. Bang HO, Dyerberg J, Sinclair HM. The composition of the Eskimo food in north western Greenland. *Am J Clin Nutr* 1980;33:2657-61.
 51. Salomon P, Kornbluth AA, Janowitz HD. Treatment of ulcerative colitis with fish oil n-3-omega-fatty acid: an open trial. *J Clin Gastroenterol* 1990;12:157-61.
 52. Belluzzi A, Brignola C, Campieri M, Pera A, Boschi S, Miglioli M. Effect of an enteric-coated fish-oil preparation on relapses in Crohn's disease. *N Engl J Med* 1996;334:1557-60.
 53. Morris MC, Evans DA, Bienias JL, et al. Consumption of fish and n-3 fatty acids and risk of incident Alzheimer disease. *Arch Neurol* 2003;60:940-6.
 54. Peet M, Horrobin DF. A dose-ranging study of the effects of ethyl-eicosapentaenoate in patients with ongoing depression despite apparently adequate treatment with standard drugs. *Arch Gen Psychiatry* 2002;59:913-9.
 55. Xia S, Lu Y, Wang J, et al. Melanoma growth is reduced in fat-1 transgenic mice: impact of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:12499-504.
 56. Funahashi H, Satake M, Hasan S, et al. Opposing effects of n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids on pancreatic cancer growth. *Pancreas* 2008;36:353-62.
 57. Vanamala J, Glagolenko A, Yang P, et al. Dietary fish oil and pectin enhance colonocyte apoptosis in part through suppression of PPARdelta/PGE2 and elevation of PGE3. *Carcinogenesis* 2008;29:790-6.
 58. Yang P, Cartwright C, Chan D, et al. Anticancer activity of fish oils against human lung cancer is associated with changes in formation of PGE2

- and PGE₃ and alteration of Akt phosphorylation. *Mol Carcinog* 2014;53:566-77.
59. Zou Z, Bellenger S, Massey KA, et al. Inhibition of the HER2 pathway by n-3 polyunsaturated fatty acids prevents breast cancer in fat-1 transgenic mice. *J Lipid Res* 2013;54:3453-63.
 60. Tanaka N, Yamaguchi H, Mano N. Transport of eicosapentaenoic acid-derived PGE(3), PGF(3alpha), and TXB(3) by ABCC4. *PLoS One* 2014;9:e109270.
 61. Shirasaka Y, Shichiri M, Kasai T, et al. A role of prostaglandin transporter in regulating PGE(2) release from human bronchial epithelial BEAS-2B cells in response to LPS. *J Endocrinol* 2013;217:265-74.
 62. Kasai T, Nakanishi T, Ohno Y, et al. Role of OATP2A1 in PGE(2) secretion from human colorectal cancer cells via exocytosis in response to oxidative stress. *Exp Cell Res* 2016;341:123-31.
 63. Gose T, Nakanishi T, Kamo S, Shimada H, Otake K, Tamai I. Prostaglandin transporter (OATP2A1/SLCO2A1) contributes to local disposition of eicosapentaenoic acid-derived PGE₃. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2016;122:10-7.
 64. Tamai I, Nozawa T, Koshida M, Nezu J, Sai Y, Tsuji A. Functional characterization of human organic anion transporting polypeptide B (OATP-B) in comparison with liver-specific OATP-C. *Pharm Res* 2001;18:1262-9.
 65. Sato M, Iwanaga T, Mamada H, et al. Involvement of uric acid transporters in alteration of serum uric acid level by angiotensin II receptor blockers. *Pharm Res* 2008;25:639-46.
 66. Nakanishi T, Haruta T, Shirasaka Y, Tamai I. Organic cation transporter-mediated renal secretion of ipratropium and tiotropium in rats and humans. *Drug Metab Dispos* 2011;39:117-22.
 67. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-75.
 68. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25:402-8.
 69. Yamaoka K, Tanigawara Y, Nakagawa T, Uno T. A pharmacokinetic analysis program (multi) for microcomputer. *J Pharmacobiodyn* 1981;4:879-85.

70. Szymczak M, Murray M, Petrovic N. Modulation of angiogenesis by omega-3 polyunsaturated fatty acids is mediated by cyclooxygenases. *Blood* 2008;111:3514-21.
71. Topper JN, Cai J, Stavrakis G, et al. Human prostaglandin transporter gene (hPGT) is regulated by fluid mechanical stimuli in cultured endothelial cells and expressed in vascular endothelium in vivo. *Circulation* 1998;98:2396-403.
72. Lejeune M, Leung P, Beck PL, Chadee K. Role of EP4 receptor and prostaglandin transporter in prostaglandin E2-induced alteration in colonic epithelial barrier integrity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010;299:G1097-105.
73. Mandery K, Bujok K, Schmidt I, et al. Influence of cyclooxygenase inhibitors on the function of the prostaglandin transporter organic anion-transporting polypeptide 2A1 expressed in human gastroduodenal mucosa. *J Pharmacol Exp Ther* 2010;332:345-51.
74. Bao Y, Pucci ML, Chan BS, Lu R, Ito S, Schuster VL. Prostaglandin transporter PGT is expressed in cell types that synthesize and release prostanoids. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002;282:F1103-10.
75. Faber KN, Muller M, Jansen PL. Drug transport proteins in the liver. *Adv Drug Deliv Rev* 2003;55:107-24.
76. Wada M, DeLong CJ, Hong YH, et al. Enzymes and receptors of prostaglandin pathways with arachidonic acid-derived versus eicosapentaenoic acid-derived substrates and products. *J Biol Chem* 2007;282:22254-66.
77. Yokoyama M, Origasa H, Matsuzaki M, et al. Effects of eicosapentaenoic acid on major coronary events in hypercholesterolaemic patients (JELIS): a randomised open-label, blinded endpoint analysis. *Lancet* 2007;369:1090-8.
78. Yoneda H, Shirao S, Nakagawara J, Ogasawara K, Tominaga T, Suzuki M. A prospective, multicenter, randomized study of the efficacy of eicosapentaenoic acid for cerebral vasospasm: the EVAS study. *World Neurosurg* 2014;81:309-15.
79. Qian X, Zhang J, Liu J. Tumor-secreted PGE2 inhibits CCL5 production in activated macrophages through cAMP/PKA signaling pathway. *J Biol Chem* 2011;286:2111-20.
80. Sharma S, Yang SC, Zhu L, et al. Tumor

- cyclooxygenase-2/prostaglandin E2-dependent promotion of FOXP3 expression and CD4⁺ CD25⁺ T regulatory cell activities in lung cancer. *Cancer Res* 2005;65:5211-20.
81. Nataraj C, Thomas DW, Tilley SL, et al. Receptors for prostaglandin E(2) that regulate cellular immune responses in the mouse. *J Clin Invest* 2001;108:1229-35.
 82. Syeda MM, Jing X, Mirza RH, Yu H, Sellers RS, Chi Y. Prostaglandin transporter modulates wound healing in diabetes by regulating prostaglandin-induced angiogenesis. *Am J Pathol* 2012;181:334-46.
 83. Swirski FK, Nahrendorf M, Etzrodt M, et al. Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science* 2009;325:612-6.
 84. Glas J, Seiderer J, Czamara D, et al. PTGER4 expression-modulating polymorphisms in the 5p13.1 region predispose to Crohn's disease and affect NF-kappaB and XBP1 binding sites. *PLoS One* 2012;7:e52873.
 85. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 2012;9:671-5.
 86. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
 87. Duffie GP, Romanelli RR, Ellis NK, Young MR, Wepsic HT. The effects of E series prostaglandins on blastogenic responses in vitro and graft vs. host responses in vivo. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1988;10:597-615.
 88. Barbieri SS, Petrucci G, Tarantino E, et al. Abnormal megakaryopoiesis and platelet function in cyclooxygenase-2-deficient mice. *Thromb Haemost* 2015;114:1218-29.
 89. Diggle CP, Parry DA, Logan CV, et al. Prostaglandin transporter mutations cause pachydermoperiostosis with myelofibrosis. *Hum Mutat* 2012;33:1175-81.
 90. Samuelsson B. PROSTAGLANDINS AND RELATED FACTORS. 28. METABOLISM OF PROSTAGLANDIN E1 IN GUINEA PIG LUNG: THE STRUCTURES OF TWO METABOLITES. *J Biol Chem* 1964;239:4097-102.
 91. Nomura T, Chang HY, Lu R, Hankin J, Murphy RC, Schuster VL. Prostaglandin signaling in the renal collecting duct: release, reuptake, and oxidation in the same cell. *J Biol Chem* 2005;280:28424-9.

92. Chi Y, Pucci ML, Schuster VL. Dietary salt induces transcription of the prostaglandin transporter gene in renal collecting ducts. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008;295:F765-71.
93. Park JY, Pillinger MH, Abramson SB. Prostaglandin E2 synthesis and secretion: the role of PGE2 synthases. *Clin Immunol* 2006;119:229-40.
94. Chan BS, Satriano JA, Pucci M, Schuster VL. Mechanism of prostaglandin E2 transport across the plasma membrane of HeLa cells and *Xenopus* oocytes expressing the prostaglandin transporter "PGT". *J Biol Chem* 1998;273:6689-97.
95. de Waart DR, Paulusma CC, Kunne C, Oude Elferink RP. Multidrug resistance associated protein 2 mediates transport of prostaglandin E2. *Liver Int* 2006;26:362-8.
96. Subra C, Grand D, Laulagnier K, et al. Exosomes account for vesicle-mediated transcellular transport of activatable phospholipases and prostaglandins. *J Lipid Res* 2010;51:2105-20.
97. Erickson JD, Eiden LE, Hoffman BJ. Expression cloning of a reserpine-sensitive vesicular monoamine transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:10993-7.
98. Yamazaki R, Kawai S, Matsumoto T, et al. Hydrolytic activity is essential for aceclofenac to inhibit cyclooxygenase in rheumatoid synovial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;289:676-81.
99. Schepers L, Casteels M, Vamecq J, Parmentier G, Van Veldhoven PP, Mannaerts GP. Beta-oxidation of the carboxyl side chain of prostaglandin E2 in rat liver peroxisomes and mitochondria. *J Biol Chem* 1988;263:2724-31.
100. Hamberg M, Samuelsson B. On the metabolism of prostaglandins E 1 and E 2 in man. *J Biol Chem* 1971;246:6713-21.
101. Granstrom E, Hamberg M, Hansson G, Kindahl H. Chemical instability of 15-keto-13,14-dihydro-PGE2: the reason for low assay reliability. *Prostaglandins* 1980;19:933-57.
102. Bothwell W, Verburg M, Wynalda M, Daniels EG, Fitzpatrick FA. A radioimmunoassay for the unstable pulmonary metabolites of prostaglandin E1 and E2: an indirect index of their in vivo disposition and pharmacokinetics. *J Pharmacol Exp Ther* 1982;220:229-35.

参考論文

Tomoka Gose, Takeo Nakanishi, Shunsuke Kamo, Hiroaki Shimada, Katsumasa Otake, Ikumi Tamai. Prostaglandin transporter (OATP2A1/*SLCO2A1*) contributes to local disposition of eicosapentaenoic acid-derived PGE₃. Prostaglandins Other Lipid Mediat 2016; **122**: 10-17.

謝辞

本研究を遂行において、終始熱心な御指導と御助言を賜りました金沢大学大学院医薬保健研究域薬学系薬物動態学研究室教授 玉井郁巳 先生に謹んで感謝の意を表します。

本研究を遂行するにあたり、終始御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました金沢大学大学院医薬保健研究域薬学系薬物動態学研究室准教授 中西猛夫 先生に謹んで謝意を表します。

本研究に関する御協力と御助言を賜りました金沢大学大学院医薬保健研究域薬学系薬物動態学研究室助教 小森久和 先生に厚く感謝いたします。

本研究遂行にあたり、抗 Oatp2a1 抗体および抗原ペプチドを提供いただきました富山大学大学院医学薬学研究部薬剤学研究室教授 細谷健一 先生に謹んで感謝申し上げます

本研究の実験に関する種々の御協力を頂き、研究遂行に御尽力頂きました加茂駿介 学士に心より感謝致します。また同研究グループとして種々の御協力と御助言を頂きました島田紘明 博士、中村吉伸 修士、清水淳也 学士、丸山詩央 学士、崎山栞 学士、青谷梨加 さん、高島大樹 君に深く感謝致します。

本研究の遂行をサポートして頂きました金沢大学薬物動態学研究室の皆様には深く感謝いたします。

最後に、金沢での生活を経済的、精神的に支え続けてくれた家族に深く感謝いたします。